

1645



JAN 22 2001
TECH CENTER 1600/2900

RECEIVED

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Tasuku Honjo et al. Art Unit : 1645
 Serial No. : 09/966,880 Examiner : Unknown #5
 Filed : September 28, 2001
 Title : NOVEL CYTIDINE DEAMINASE

Commissioner for Patents
 Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from the following application(s):

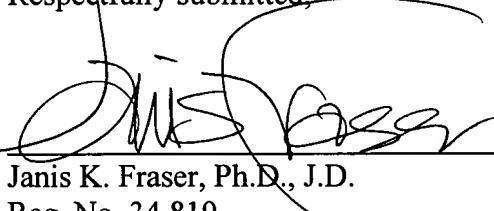
- Japan Application No. 11-87192 filed March 29, 1999
- Japan Application No. 11-371382 filed December 27, 1999
- Japan Application No. 11-178999 filed June 24, 1999

A certified copy of each application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: Jan. 2, 2002


 Janis K. Fraser, Ph.D., J.D.
 Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.
 225 Franklin Street
 Boston, Massachusetts 02110-2804
 Telephone: (617) 542-5070
 Facsimile: (617) 542-8906

20365034.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

January 2, 2002
 Date of Deposit
Kathleen Philpot
 Signature
KATHLEEN PHILPOT
 Typed or Printed Name of Person Signing Certificate

RECEIVED

JAN 22 2001

TECH CENTER 1600/2900



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月29日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第087192号

出願人
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社
本庶 佑

2001年10月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3090583

【書類名】 特許願
【整理番号】 J1-101
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C07K 14/00
C07K 16/00
C12N 5/00
A61K 39/00

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区北白川追分町
【氏名】 本庶 佑

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎壱町田町4-1
【氏名】 村松 正道

【特許出願人】

【識別番号】 000004569
【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社
【代表者】 水野 勝

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規シチジンデアミナーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクをコードするDNAまたはその断片。

【請求項2】 該タンパクが、シチジンデアミナーゼ活性を有することを特徴とする請求項1に記載のDNAまたはその断片。

【請求項3】 配列番号1に記載される塩基配列を含むDNAまたはその断片。

【請求項4】 配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号93乃至689の塩基配列を有するDNAまたはその断片。

【請求項5】 配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリングエントな条件下でハイブリダイズし、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクの相同タンパクでありシチジンデアミナーゼ活性を有する哺乳動物由来のタンパクをコードするDNAまたはその断片。

【請求項6】 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその断片。

【請求項7】 配列番号2に記載されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパクであって、シチジンデアミナーゼ活性を有するタンパクまたはその断片。

【請求項8】 配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリングエントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクの相同タンパクでありシチジンデアミナーゼ活性を有する哺乳動物由来のタンパク

【請求項9】 請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のDNA若しくはその断片を含む発現ベクター。

【請求項10】 請求項9記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

【請求項11】 請求項6乃至請求項8のいずれかに記載のタンパクまたは

その断片に反応性を有する抗体または該抗体の一部。

【請求項12】 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項11記載の抗体または該抗体の一部。

【請求項13】 請求項11または請求項12記載の抗体若しくは該抗体の一部及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項14】 請求項6乃至請求項8のいずれかに記載のタンパクまたはその断片に反応性を有するモノクローナル抗体を產生する細胞。

【請求項15】 該細胞が、モノクローナル抗体を產生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする請求項14に記載の細胞。

【請求項16】 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする請求項15に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、シチジンデアミナーゼ活性を有する新規タンパク及びその断片、該タンパクをコードするDNA及びその断片、該DNAを含む発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された形質転換細胞、該タンパク若しくはその断片に反応性を有する抗体、並びに該抗体を產生する細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

哺乳動物の胚中心 (germinal center) は、B細胞の抗原特異的記憶細胞細胞 (antigen specific memory cell) や長命形質細胞 (long-lived plasma cell) への成熟の最終過程に必要な極めて特化した微小環境を構成する (Embo J., Vol. 16, No.11, p.2996-3006, 1991; Semin. Immunol., Vol.4, No.1, p.11-17, 1992)。この微小環境では、免疫グロブリンの遺伝子情報の2つの主要な編集が起こることが知られている (J. Exp. Med., Vol.173, No.5, p.1165-1175, 1991;

Embo. J., Vol.12, No.13, p.4955-4967, 1993; Adv. Exp. Med. Biol., Vol.186, p.145-151, 1985; Nature, Vol.342, No.6252, p.929-931, 1989; Cell, Vol.67, No.6, p.1121-1129)。

【0003】

一つは、体細胞超変異 (somatic hypermutation) (Curr. Opin. Immunol., Vol.7, No.2, p.248-254, 1995; Annu. Rev. Immunol., Vol.14, p.441-457, 1996; Science, Vol.244, No.4909, p.1152-1157, 1989) として知られる免疫グロブリンの可変領域をコードするエクソン遺伝子における広範囲にわたる点変異 (point mutation) である。この点変異の蓄積により、細胞表面上に高親和性の免疫グロブリンを発現するB細胞の選別並びにそれに伴う抗体の親和性成熟 (affinity maturation) が生じる (Embo. J., Vol.4, No.2, p.345-350, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.85, No.21, p.8206-8210, 1988)。

【0004】

もう一つは、クラススイッチ組換え (class switch recombination; CSR) である。この組換えは、免疫グロブリンの重鎖定常領域をコードするエクソンを取り替えることにより、補体結合 (complement fixation) のような抗体のエフェクター機能を決定付けるものである (Curr. Top. Microbiol. Immunol., Vol.217, p.151-169, 1996; Annu. Rev. Immunol., Vol.8, p.717-735, 1990)。

これら2つのタイプの遺伝子編集 (genetic editing) は、有害な微生物を除去するための有効な体液性免疫応答にとって極めて重要である。これらの遺伝子的事象の分子メカニズムは、数十年にわたる精力的な研究にも拘らず未だ解明されていない。

【0005】

本発明者らは、免疫グロブリンのクラススイッチの分子メカニズムを解明するための研究ツールとしてマウスB細胞クローニングCH12F3-2を単離した。このB細胞では、IL-4、TGF- β 及びCD40Lによる刺激の数時間後にIgMからIgAへのクラススイッチ組換え (CSR) が始まり、最終的に80%以上の細胞がIgA陽性に至る (Immunity, Vol.9, p.1-10, 1998; Curr. Biol., Vol.8, No.4, p.227-230, 1998; Int. Immunol., Vol.8, No.2, p.193-201, 1996)。

【0006】

このマウスB細胞クローニングCH12F3-2を用いて、本発明者らはさらにクラススイッチ組換えの誘発点（breakpoint）が、スイッチ領域（switch region; S region）と称される特徴的な反復配列にだけでなく、その隣接配列中にも分布することを報告してきた（Curr. Biol., Vol.8, No.4, p.227-230, 1998）。しかしながら、該誘発点は、スイッチ領域で分断されるIエクソン及びCエクソン中、即ち生殖系列転写物のイントロン中での存在は希であった。また、これまでに蓄積された科学的証拠により、Iエクソン及びCエクソンの転写並びに該転写物のスプライシングがクラススイッチ組換えに必須であるということが示されている（Cell, Vol.73, No.6, p.1155-1164, 1993; Science, Vol.259, No.5097, p.984-987, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol.90, No.8, p.3705-3709, 1993; Cell, Vol.81, No.6, p.833-836, 1995）。

【0007】

これは即ち、クラススイッチ組換えにおいて該転写物が直接的または間接的に関与していることを示唆するものである。このことから本発明者らは、クラススイッチは、スイッチ領域自体の認識ではなく、DNAとRNAの複合体の構造が認識することにより開始されるとの理論を提唱するものである。この考え方は、前記マウスB細胞クローニングCH12F3-2にミニ染色体を導入することによりS α 領域をS ϵ 領域またはS γ 領域に置き換えた場合であっても、該細胞はサイトカインの刺激によりクラススイッチ組換えを効率的に起こすという事実によってさらに裏付けられる（Immunity, Vol.9, p.1-10, 1998）。

【0008】

一方、植物や原生動物においては、他のタイプの遺伝子編集（genetic editing）であるRNA編集が、限られたゲノムから機能的な遺伝子を生み出すための手段として広く用いられる（Cell, Vol.81, No.6, p.833-836, 1995; Cell, Vol.81, No.6, p.837-840, 1995）。例えば、アポリポプロテインB（apoB）、AMPA受容体、Wilms tumor-1、 α ガラクトシダーゼ及びneurofibromatosis type-1のmRNA並びにtRNA-Aspを含め非常に多くの哺乳動物のmRNAの編集が報告されている（Trends Genet., Vol.12, No.10, p.418-424, 1996; Curr. Opin. Genet. Dev., Vo

1.6, No.2, p.221-231, 1996)。RNA編集の分子メカニズムは未だ解明されていないが、APOBEC-1 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-1) により行われるapoBのmRNAの編集については多くの報告がなされている (Science, Vol.260, No.5115, p.1816-1819, 1993; J. Biol. Chem., Vol.268, No.28, p.20709-20712, 1993)。

【0009】

apoBのRNA編集では、2153残基目のグルタミンをコードするコドンCAAが最初の塩基CのUへの変化によりUAA、即ちapoBのmRNA中のin-frameストップコドンへと変化する (J. Cell., Vol.81, No.2, p.187-195, 1995; J. Cell., Vol.50, No.6, p.831-840, 1987; Science, Vol.238, No.4825, p.363-266, 1987)。apoB-100及びapoB-48は、各々編集されたapoBのmRNA及び未編集のmRNAの翻訳物であり、これらの蛋白は、各々全く異なった生理学的機能を有する (J. Biol. Chem., Vol.271, No.5, p.2353-2356, 1996)。

【0010】

APOBEC-1による部位特異的RNA編集 (site specific RNA-editing) には、補助因子 (auxiliary factor) が必要とされる (Science, Vol.260, No.5115, p.1816-1819, 1993; J. Biol. Chem., Vol.268, No.28, p.20709-20712, 1993)。補助因子がない場合には、APOBEC-1は、シチジンデアミナーゼ活性を示すだけであり、RNAに対しては非特異的な低い親和性しか有しない (J. Biol. Chem., Vol.268, No.28, p.20709-20712, 1993; J. Cell., Vol.81, No.2, p.187-195, 1995; J. Biol. Chem., Vol.270, No.24, p.14768-14775, 1995; J. Biol. Chem., Vol.270, No.24, p.14762-14767, 1995)。該補助因子の発現及び活性は、apoBのmRNAの編集が起こっている個体でだけでなく、APOBEC-1を検出不能なレベルでしか発現していない個体あるいはapoBのmRNAの編集が起こっていない個体においても見られる (Science, Vol.260, No.5115, p.1816-1819, 1993; J. Biol. Chem., Vol.268, No.28, p.20709-20712, 1993; Nucleic Acids Res., Vol.22, No.10, p.1874-1879, 1994; Proc Natl. Acad. Sci., USA, Vol.91, No.18, p.8522-8526, 1994; J. Biol. Chem., Vol.269, No.34, p.21725-21734, 1994)。

【0011】

このようなapoBのmRNAの編集に伴う該補助因子の不調和的な発現は、該補助因子がより一般的な細胞性機能に関与するか、あるいは他の未知のRNAの編集に関与する可能性を暗示するものである。免疫グロブリンに係る遺伝子編集であるクラススイッチ組換え (CSR) 及び超変異 (hypermutation) においてはRNA編集を含む可能性を有することから、上述した免疫グロブリン遺伝子の遺伝子編集においてRNA編集が起こっているか否かを明らかにすることは非常に興味深い。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、RNA編集酵素の1つであるAPOBEC-1と構造的な関連性を有し、免疫グロブリン遺伝子の遺伝子編集などが起こる胚中心B細胞でのRNA編集に関与する新規なシチジンデアミナーゼであるAID (Activation-Induced cytidine Deaminase) 、並びに該酵素をコードするDNAを提供するものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、免疫グロブリン遺伝子の主要な遺伝子編集の一つであるクラススイッチ組換え (CSR) に関する新規遺伝子について鋭意探索した結果、サイトカインの刺激による細胞の活性化に伴い極めて高い割合でIgMからIgAへのクラススイッチ組換えを起こすことが証明されているマウスB細胞クローニングCH12F3-2について、刺激を与えた該B細胞と未刺激の該B細胞の場合の各々についてcDNAライブラリーを作製し、これらを用いてサブトラクションクローニングを行うことにより、RNA編集酵素の1つであるAPOBEC-1と構造的な関連性を有し、APOBEC-1と同様のシチジンデアミナーゼ活性を有するAID (Activation-Induced cytidine Deaminase) と命名した新規タンパクをコードする遺伝子を見出した。

【0014】

本発明のAIDタンパクは、下記のような特徴を有し、B細胞の活性化の制御、並びに免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換え、体細胞超変異 (somatic hypermutation) 及びアフィニティーマチュレーション (affinity maturation) のような胚中心機能 (germinal center function) に特有な遺伝子修飾 (genetic editing) において重要な役割を担うRNA修飾デアミナーゼであると考えられる

【0015】

- (1) AID蛋白をコードするcDNAのORFは、分子量が約24kDaと算出される198個のアミノ酸から構成される（配列番号2）。
- (2) AID蛋白のORFのアミノ酸配列は、APOBEC-1 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-1) と34%のアミノ酸同一性を有する。
- (3) AID蛋白は、シトシン ヌクレオシド/ヌクレオチド デアミナーゼ ファミリー (cytosine nucleoside/nucleotide deaminase family) に属する蛋白のアミノ酸配列中に保存されているデアミナーゼ活性の活性部位であるシチジンデアミナーゼモチーフ (cytidine deaminase motif) 及びデオキシシチジンデアミナーゼモチーフ (deoxycytidine deaminase motif) を有している。
- (4) AID蛋白のシチジンデアミナーゼモチーフは、RNA編集デアミナーゼのサブグループに近縁である。
- (5) AID蛋白は、APOBEC-1と同様に、蛋白と蛋白との相互作用に重要であると考えられているロイシンに富んだ領域 (Leucine-rich region) を有している。また、該AID蛋白のLeucine-rich region中の4つのロイシンは、ウサギ、ラット、マウス及びヒトのAPOBEC-1のLeucine-rich region中に保存されている。

【0016】

- (6) AID蛋白の一次構造中には、APOBEC-1がRNAに結合するための必須のアミノ酸残基であると報告されている全てのアミノ酸残基 (Phe66、Phe87、His61、Glu63及びCys93) が保存されている。
- (7) AID蛋白は、APOBEC-1及びE.coli由来のシチジンデアミナーゼ (ECCDA) と同様に、C末端側にホモダイマーを形成するための偽活性化部位ドメイン (pseudooactive site domain) を有していた。AID蛋白は、ホモダイマーを形成する可能性、または他の補助蛋白と会合する可能性がある。
- (8) AID蛋白は、濃度依存的なシチジンデアミナーゼ活性を示す。このシチジンデアミナーゼ活性は、シチジンデアミナーゼの特異的阻害剤であるテトラヒドロウリジン (tetrahydouridine, THU) により濃度依存的に阻害される。また、AID蛋白のシチジンデアミナーゼ活性は、亜鉛キレート化剤である1,10-o-phenan-

throlineにより阻害される一方で、その不活性型異性体である1,7-o-phenanthrolineでは阻害が弱いことから、AID蛋白は、APOBEC-1と同様に亜鉛依存的シチジンデアミナーゼであると考えられる。

(9) AID蛋白のmRNAは、腸管膜リンパ節 (mesenteric lymphnode) で強い発現が見られる。また、脾臓でも弱い発現が見られる。

(10) AID蛋白のmRNAの発現は、胸腺以外の各種リンパ性組織 (ペイヤーズパッチ (Peyer's patch) 、腸管膜リンパ節、腋窩リンパ節、脾臓、骨髓) で見られる。特に、リンパ節やペイヤーズパッチなどの末梢リンパ器官で顕著な発現が見られる。一方、一次性リンパ器官での発現は該末梢リンパ器官での発現と比べ低い。

【0017】

(11) サイトカイン (IL-4, CD40L, TGF- β) による刺激により IgMから IgAへのクラススイッチが起こるマウス B 細胞クローニングCH12F3-2でのAID mRNAの発現は、該サイトカインによる刺激がない場合には検出不可能な程度であるが、サイトカインの刺激により、刺激後約3時間で発現が誘導され、約12時間後に最大の発現が見られる。

(12) マウス B 細胞クローニングCH12F3-2でのAID mRNAの発現は、IL-4、CD40L及びTGF- β のいずれか1つのサイトカインによる刺激に比べ、該3種類のサイトカインで刺激した場合に強い発現が誘導される。また、このマウス B 細胞クローニングCH12F3-2でのサイトカインによるAID mRNAの発現誘導は、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシドにより阻害されることから、AID mRNAの発現増強には、蛋白のドユ・ノボ合成 (de novo synthesis) が必要であると考えられる。

(13) *in vitro*試験においては、正常マウス脾臓 B 細胞を、LPSのみ、LPS+IL-4、またはLPS+TGF- β で刺激するとAID mRNAの発現増強が見られる。

(14) *in vivo*試験においては、正常マウスを、生体に投与するとクローナル細胞増幅 (clonal expansion) 及び胚中心形成 (germinal center formation) を誘導し免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換え及びアフィニティーマチュレーションを引き起こすことが知られている羊赤血球 (SRBC) で免疫すると、免疫後5日目以降にAID mRNAの有意な発現増強が見られる。

(15) SRBCによる免疫により誘導されるin vivoでのAID mRNAの発現増強は、脾臓のCD19陽性B細胞で特異的に見られる。

(16) リンパ性器官でのAID mRNAの発現誘導は、抗原による刺激により活性化されたB細胞を多く含んでいる胚中心で特異的に見られる。

【0018】

上記のような性状から、本発明のAID蛋白は、種々の疾患を惹起する引き金となる非自己抗原（外来性抗原、自己反応性細胞など）を生体から排除するための抗原特異的免疫グロブリン（特異性抗体）の生成に必要な種々の生体メカニズムを制御する機能を有すると考えられる。抗原に高い特異性を有する免疫グロブリンの生成のメカニズムとしては、B細胞の活性化、免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換え、体細胞超変異（somatic hypermutation）及びアフィニティーマチュレーション（affinity maturation）のような胚中心機能（germinal center function）が挙げられる。本発明のAID蛋白は、そのような胚中心B細胞で起こるRNA編集等の種々の遺伝子修飾（genetic editing）において重要な役割を担う酵素の一つと考えられる。

【0019】

従って、本発明のAID蛋白及びAID蛋白をコードする遺伝子の機能を制御することにより、例えばB細胞の機能不全（例えば、IgA欠損症、IgA腎症、γグロブリン血症、高IgM血症など）あるいは免疫グロブリンのクラススイッチの不全に起因する種々の免疫不全症の予防並びに治療する医薬品開発のターゲットとなり得る。

即ち、本発明のAID蛋白及びその断片、AID蛋白をコードするDNA及びその断片、並びにAID蛋白に対する抗体は、そのような医薬品開発のための試薬として有用である。

【0020】

また、該DNAは、それ自体AID遺伝子の機能を遺伝子レベルで制御するアンチセンス医薬品として、また遺伝子治療での使用において有用である。該タンパクまたはその断片（例えば、酵素活性部位）は、その自体医薬品として有用である。

【0021】

さらに本発明のAID蛋白に反応性を有する抗体またはその一部は、AID蛋白の機能を制御することによる抗体医薬品として極めて有用である。

さらに、本発明の遺伝子（D N A）、タンパク、及び抗体は、本発明のタンパク（酵素）と相互作用（結合）する基質（例えば、RNAなど）あるいは本発明のタンパクと会合する他の補助蛋白の探索、並びに該基質や補助蛋白をターゲットとした医薬品を開発するための試薬として有用である。

【0022】

また、本発明のD N Aの態様の一つである哺乳動物（マウスなど）由来のAID蛋白の遺伝子情報をもとに、それらの遺伝子を破壊（不活性化）することによりモデル動物を作成することが可能である。このモデル動物の物理学的、生物学的、病理学的及び遺伝子的特徴を分析することにより、本発明に係る遺伝子及びタンパクの機能を解明することが可能となる。

さらに、そのようにして内在性遺伝子が破壊された該モデル動物、本発明の態様の一つであるヒト由来のAID遺伝子を導入することにより、本発明のヒト由来のAID遺伝子のみを有するモデル動物を作成することが可能である。このモデル動物に、該導入されたヒト由来AID遺伝子をターゲットとした薬剤（化合物、抗体等）を投与することにより、その薬剤の治療学的效果を評価することが可能となる。

【0023】

本発明は、即ち、下記のD N A、タンパク、発現ベクター、形質転換体、抗体医薬組成物、及び細胞を初めて提供するものである。

（1）配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクをコードするD N Aまたはその断片。

（2）該タンパクが、シチジンデアミナーゼ活性を有することを特徴とする前記（1）に記載のD N Aまたはその断片。

（3）配列番号1に記載される塩基配列を含むD N Aまたはその断片。

（4）配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号93乃至689の塩基配列を有するD N Aまたはその断片。

(5) 配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクの相同タンパクでありシチジンデアミナーゼ活性を有する哺乳動物由来のタンパクをコードするDNAまたはその断片。

(6) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその断片。

(7) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパクであって、シチジンデアミナーゼ活性を有するタンパクまたはその断片。

(8) 配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクの相同タンパクでありシチジンデアミナーゼ活性を有する哺乳動物由来のタンパク

(9) 前記(1)乃至(5)のいずれかに記載のDNA若しくはその断片を含む発現ベクター。

(10) 前記(9)記載の発現ベクターで形質転換された形質転換細胞。

(11) 前記(6)乃至(8)のいずれかに記載のタンパクまたはその断片に反応性を有する抗体または該抗体の一部。

(12) 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする前記(11)記載の抗体または該抗体の一部。

(13) 前記(11)または(12)記載の抗体若しくは該抗体の一部及び薬学的に許容され得る担体を含んでなる医薬組成物。

(14) 前記(6)乃至(8)のいずれかに記載のタンパクまたはその断片に反応性を有するモノクローナル抗体を產生する細胞。

(15) 該細胞が、モノクローナル抗体を產生する能力を有する非ヒト哺乳動物由来のB細胞と哺乳動物由来のミエローマ細胞とを融合して得られる融合細胞であることを特徴とする前記(14)に記載の細胞。

(16) 該細胞が、該モノクローナル抗体の重鎖をコードするDNA若しくはその軽鎖をコードするDNAのいずれか一方のDNA、または両方のDNAが細胞

内に導入されることにより形質転換された遺伝子組換え細胞であることを特徴とする前記(15)に記載の細胞。

【0024】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で用いる語句の意味、並びに本発明のタンパク、DNA、抗体及び細胞の一般的製造方法を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明の「タンパクまたはその断片」とは、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ、ラット、ハムスター、モルモット、及びマウスなどの哺乳動物由来のタンパク及びその断片(フラグメント)であり、好ましくはヒト、ウサギ、ラットまたはマウス由来のタンパク若しくはその断片であり、特に好ましくはヒトまたはマウス由来のタンパク及びその断片(フラグメント)である。

【0025】

特に好ましい態様としては、下記のいずれかのタンパクまたはその断片である

<1>配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクまたはその断片。

<2>配列番号2に記載されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパクであって、シチジンデアミナーゼ活性を有するタンパクまたはその断片。

<3>配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクの相同タンパクでありシチジンデアミナーゼ活性を有する哺乳動物由来のタンパク。

【0026】

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び/または修飾されているアミノ酸配列を有するタンパク、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有することを意味する。

【0027】

本発明のタンパクには、モノマー(monomer)分子、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖と会合してなるホモダイマー(homodimer)、異なるアミノ酸配列を有する他のもう1本の鎖と会合してなるヘテロダイマー(heterodimer)、及びトリマー(trimmer)やテトラマー(tetramer)などのオリゴマー(origomer)も含まれる。

【0028】

また「タンパクの断片」とは、上述した本発明のAID蛋白が有するアミノ酸配列中の任意の部分配列(フラグメント)を意味し、例えば、AID蛋白がシチジンデアミナーゼ活性に代表されるような酵素活性を発現するために必須である酵素活性部位、あるいはAID蛋白が基質(例えば、RNAなど)や種々の補助蛋白と結合若しくは会合するために必須な相互作用部位などを挙げることができる。

【0029】

本願明細書または図面においてアミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの三文字あるいは一文字は、各々次に示すアミノ酸を意味する。

(Gly/G) グリシン、(Ala/A) アラニン、(Val/V) バリン、(Leu/L) ロイシン、(Ile/I) イソロイシン、(Ser/S) セリン、(Thr/T) スレオニン、(Asp/D) アスパラギン酸、(Glu/E) グルタミン酸、(Asn/N) アスパラギン、(Glu/Q) グルタミン、(Lys/K) リジン、(Arg/R) アルギニン、(Cys/C) システイン、(Met/M) メチオニン、(Phe/F) フェニルアラニン、(Tyr/Y) チロシン、(Trp/W) トリプトファン、(His/H) ヒスチジン、(Pro/P) プロリン。

【0030】

本発明のタンパク及びフラグメントは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

また、本発明のAID蛋白を他の蛋白(例えば、GST(Glutathione S-transferase)など)との組換え融合蛋白として発現させることもできる。この場合には、GSTに特異的に結合する他の蛋白分子を固定化した吸着剤を用いるアフィニティー

カラムクロマトグラフィーを用いることにより該融合蛋白を極めて容易に精製することが可能であるという点で利点を有する。さらに、該GSTに対する種々の抗体が提供されていることから、該GSTに対する抗体を用いたイムノアッセイ(ELISAなど)により、該融合蛋白の定量を簡便に行うことができる。

【0031】

本発明のDNAは、前述の本発明のタンパクまたはその断片をコードするDNAであって、本発明のタンパクをコードし得るいかなる塩基配列をも包含し、ゲノミックDNAまたはcDNAのいずれをも包含する。また、該DNAは、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコドンから構成されるDNAをも含む。

また、本発明におけるDNAは、哺乳動物のAID蛋白をコードするDNAを包含し、好ましい態様としては、マウスAID蛋白またはヒトAID蛋白をコードするDNAを挙げることができる。

【0032】

具体的な態様としては、下記が挙げられる。

<1>配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクをコードするDNA。

<2>該タンパクが、シチジンデアミナーゼ活性を有することを特徴とする前記(1)に記載のDNA。

<3>配列番号1に記載される塩基配列を含むDNA。

<4>配列番号1に記載される塩基配列の塩基番号93乃至689の塩基配列を有するDNA。

<5>配列番号1に記載される塩基配列を有するDNAにストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するタンパクの相同タンパクでありシチジンデアミナーゼ活性を有する哺乳動物由来のタンパクをコードするDNA。

【0033】

また、上記に定義した本発明のAID蛋白あるいはその断片を構成するアミノ酸配列中に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましく

は1乃至5個のアミノ酸を置換、欠失及び／または修飾するか、若しくは該アミノ酸配列に複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸を挿入することによって得られる変異タンパク若しくはその断片をコードするDNAも本発明のDNAに包含される。

【0034】

ここで「ストリンジエントな条件下」としては、例えば、次のような条件を挙げることができる。例えば、50塩基以上のプローブを用い、0.9%NaCl下でハイブリダイゼーションを行う場合には、50%の解離を生ずる温度(T_m)の目安を下記計算式から求め、ハイブリダイゼーションの温度を下記計算式のように設定することができる。

【0035】

$$T_m = 82.3^\circ\text{C} + 0.41 \times (\text{G}+\text{C}) \% - 500/n - 0.61 \times (\text{フォルムアミド}) \%$$

(nはプローブの塩基数を示す。)

$$\text{温度} = T_m - 25^\circ\text{C}$$

また、100塩基以上のプローブ(G+C=40~50%の場合)を用いる場合には、 T_m が下記(1)及び(2)のように変化することを目安する。

(1) 1%ミスマッチ毎に、 T_m が約1°C下がる。

(2) フォルムアミド1%毎に、 T_m が0.6~0.7°C下がる。

従って、完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) 65~75°C (フォルムアミド無添加)

(B) 35~45°C (50%フォルムアミド存在下)

また、不完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) 45~55°C (フォルムアミド無添加)

(B) 35~42°C (30%フォルムアミド存在下)

また、23塩基以下のプローブを用いる場合の温度条件は、37°Cとすることもできるし、また下記計算式を目安とすることもできる。

$$\text{温度} = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T} \text{の数}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{C}+\text{G} \text{の数}) - 5^\circ\text{C}$$

【0036】

また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA(cDNA)、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを録型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

本発明のタンパクをコードするDNAは、常法に従って本発明のタンパクのmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、化学合成する方法等により取得することができる。

【0037】

(1) 例えば、本発明のタンパクのmRNAからcDNAをクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

まず、本発明のタンパクを発現・産生する前述のような組織あるいは細胞から該本発明のタンパクをコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法(Chirgwinら、*Biochemistry*, Vol.18, p.5294, 1979)、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ(dT)セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

【0038】

次いで得られたmRNAを録型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法(*Mol. Cell. Biol.*, Vol.2, p.161, 1982; *Mol. Cell. Biol.*, Vol.3, p.280, 1983)やHoffmanらの方法(*Gene*, Vol.25, p.263, 1983)等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクターまたはコスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入(トランスフェクト)することによりcDNAライブラリーを作製する。

【0039】

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるもの

であれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてpUC19、 λ gt10、 λ gt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で本発明のタンパクをコードする遺伝子を発現させうるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

【0040】

プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばManiatisらの方法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p.1.53, 1989) に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、Hyunhらの方法 (DNA Cloning, a practical approach, Vol.1, p.49, 1985) などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット (例えば、宝酒造製等) を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞 (例えば、E. coli: HB101, DH5 α またはMC1061/P3等) 等の適当な宿主に導入する。

【0041】

プラスミドを宿主に導入する方法としては、(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Vol.1.74, 1989) に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット (例えば、ストラタジーン製、アマシャム製等) を用いることによって簡便に行うことができる。

【0042】

本発明のAID蛋白のようにサイトカイン等の刺激に依存して細胞内で産生が増強される蛋白をコードするcDNAの同定は、刺激を与えた細胞由来のmRNAを基に作製したcDNAライブラリー (tester cDNA library) と未刺激の細胞由来のmRNAを基に作製したcDNAライブラリー (driver cDNA library) の2つのcDNAライブラリーを用い、例えば、抑制PCR効果 (Nucleic Acids Res., Vol.23, p.1087-1088

, 1995) を利用したサプレッションサブトラクトハイブリダイゼーション法 (suppression subtract hybridization (SSH)) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, p.6025-6030, 1996; Anal. Biochem., Vol.240, p.90-97, 1996) により同定することができる。

【0043】

サブトラクションクローニングに必要なcDNAライブラリーの調製は、市販のキット、例えば、PCR-Select Subtraction Kit (CLONTECH製、カタログ番号：K1804-1) を用いることができる。実験操作は、該キットに添付の実験操作手順書に従って行うことができる。

【0044】

具体的実験操作の一例を以下に概略する。

適切な刺激物質で刺激した細胞、及び未刺激の細胞の各々から、既報 (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998) と同様にしてpolyA⁺RNAをする。次いで、各々のpolyA⁺RNA試料を基に逆転写酵素を用い常法に従ってcDNAを調製する。刺激した細胞から調製したcDNAをテスターcDNA (tester cDNA) として、また未刺激の細胞由来のcDNAをドライバーcDNA (driver cDNA) として用いる。

前記既報及び該市販のキットに添付の実験操作マニュアルに従って、テスターcDNAにドライバーcDNAを加えサブトラクションを行う。なお、サブトラクションの効率は、テスターcDNAに、コントロールとして適当な外来性DNAを少量加えることによりモニターする。サブトラクションの後、該外来性DNAを濃縮する。

サブトラクションされたcDNA (subtracted cDNA) を、常法に従って適当なプラスミド発現ベクター中にクローニングしプラスミドライブラリーを作製する。

【0045】

既報と同様にして、該ライブラリーの多数のコロニーを、ディファレンシャルハイブリダイゼーション法によりスクリーニングする (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998; 臨床免疫, Vol.29, No. Suppl.17, p.451-459, 1997)。ここで、ハイブリダイゼーションプローブとしては、前記テスターcDNA及びドライバーcDNAの各々を放射性標識したものを用いることができる。なお、

目的のDNAを含むクローンと前記外来性DNAを含むクローンの区別は、レプリカントフルターに該外来性DNAをハイブリダイズさせることにより行うことができる。

放射性標識ドライバーcDNAプローブよりも放射性標識テスターcDNAプローブに對してより強いシグナルを発するクローンを同定し、目的のcDNAまたはcDNA断片を得ることができる。

【0046】

また、本発明のタンパクをコードするcDNAの単離は、他の一般的なcDNAのスクリーニング法を用いることによっても行うことができる。

例えば、前記のサブトラクションクローニングで単離した本発明のタンパクをコードするcDNA若しくはcDNA断片、あるいは別個に化学合成した本発明のタンパクのアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを³²Pでラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法 (Crunsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.72, p.3961, 1975) またはブラークハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p.2.108, 1989) により、市販または所望に応じ独自に調製したcDNAライブラリーをスクリーニングする方法が挙げられる。さらに、前記のサブトラクションクローニングで単離した本発明のタンパクをコードするcDNA若しくはcDNA断片の塩基配列を基に一対のPCRプライマーを作製し、全長cDNAライブラリーを鑄型として該プライマーを用いたPCRにより本発明のタンパクをコードするcDNAを含むDNAを増幅する方法を挙げることができる。

【0047】

cDNAを発現しうる発現ベクターを用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、本発明のタンパクに反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキサム・ギルバート法 (マキサム (Maxamら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.74, p.560, 1977) あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法 (Sangerら、Proc.

Natl. Acad. Sci. USA., Vol.74, p.5463-5467, 1977) によって決定することができる。市販のDNAシークエンサーを用いると簡便に塩基配列を決定することができる。

本発明のタンパクをコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

【0048】

(2) また、前述のような本発明のタンパクを発現する細胞に由来するゲノムDNAから本発明のタンパクをコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから本発明のタンパクをコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

例えば、ヒト由来タンパクをコードするcDNAを取得する場合には、さらにヒトゲノムDNA(染色体DNA)が導入されたコスミドライブラリーを作製(「ラボマニュアルヒトゲノムマッピング」、堀雅明及び中村祐輔 編、丸善 出版)し、該コスミドライブラリーをスクリーニングすることにより、目的タンパクのコーディング領域のDNAを含む陽性クローンを得、該陽性クローンから切り出したコーディングDNAをプローブとして用い、前述のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより調製することもできる。

【0049】

さらに本発明は、上述の本発明のタンパクをコードするDNAを含有する組換えベクターに関する。本発明の組換えベクターとしては、原核細胞及び/または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される。

【0050】

当該組換えベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA）に本発明のタンパクをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。

用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、 λ ファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス（pVL1393、インビトロゲン製）が例示される。

【0051】

本発明のタンパクをコードするDNAを発現させ本発明のタンパクを生産させる目的においては、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のタンパクをコードする遺伝子を発現し、これら蛋白質を生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMAL C2、pEF-BOS（ヌクレオイックアシッドリサーチ（Nucleic Acid Research）、第18巻、第5322頁、1990年等）あるいはpME18S（実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等）等を挙げることができる。

また、本発明のタンパクは他の別のタンパクとの融合蛋白として製造することもできる。例えば、GST（Glutathione S-transferase）との融合蛋白として調製する場合には、本発明の蛋白をコードするcDNAを、例えば、プラスミドpGEX4T1（Pharmacia製）中にサブクローニングし、大腸菌DH5 α を形質転換して該形質転換体を培養することにより調製することができる。

【0052】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明のタンパクをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マークー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子（マークー）を含んでいてもよい。

【0053】

細菌中で本発明のタンパクを発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーター及びShine-Dalgarno (SD) 配列（例えば、AAG Gなど）を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のタンパクを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV40、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

【0054】

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (ATG) が例示される。

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGA、TAA）が例示される。

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

【0055】

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能

力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、*E. coli* ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母では酵母2μプラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149等があげられる。

【0056】

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

【0057】

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスクカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4 DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素切断部位など）を用いることができる。

【0058】

本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することによ

り調製することができる。

本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞など）が例示される。

【0059】

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌（DH5 α 、TB1、HB101等）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞（PC12,PC12h）、ハムスター由来細胞（BHK及びCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1及びVero等）およびヒト由来細胞（HeLa、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞およびHepG2等）などが例示される。

【0060】

発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換（形質移入））は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（*E.coli*、*Bacillus subtilis* 等）の場合は、例えばCohenらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.69, p.2110, 1972）、プロトプラスト法（Mol. Gen. Genet., Vol.168, p.111, 1979）やコンピテント法（J. Mol. Biol., Vol.56, p.209, 1971）によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.75, p.1927, 1978）やリチウム法（J. Bacteriol., Vol.153, p.163, 1983）によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法（Virology, Vol.52, p.456, 1973）、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法（Mol. Cell. Biol., Vol.3, p.2156-2165, 1983）によってそれぞれ形質転換することができる。

【0061】

本発明のタンパクは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞（以下、形質移入体を包含する意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって製造することができる。

栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含でいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチーブ・リカーペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。

【0062】

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

宿主がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地（Millerら、Exp. Mol. Genet. Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972）等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

【0063】

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培（Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, p.4505, 1980）が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM

培地 (Science, Vol.122, p.501, 1952) 、 DMEM培地 (Virology, Vol.8, p.396, 1959) 、 RPMI1640培地 (J. Am. Med. Assoc., Vol.199, p.519, 1967) 、 199培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.73, p.1, 1950) 等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40°Cで約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's 培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p.8404, 1985) 等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40°Cで15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0064】

本発明のタンパクは、上述のような形質転換細胞、特に動物細胞を培養し、培養上清中に分泌させることにより製造することができる。

得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液（上清）を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該本発明のタンパクを精製、単離する。

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0065】

一方、本発明のタンパクが培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合（例えば、大腸菌）は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および/または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明のタンパクを含有する膜画分を得る。該膜画分をトライトン-X100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る

。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

【0066】

本発明のタンパクに包含されるヒト由来のAIDタンパクをコードするDNA(cDNAまたはゲノミックDNA)を用いれば、ヒトAID蛋白を生体内に分泌するトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製することができる。即ち、該ヒト由来のDNAが、非ヒト哺乳動物(例えばマウス)の内在性遺伝子座上にインテグレート(integrate)されることにより、体内に該DNAによりコードされる本発明のヒトAID蛋白が発現、分泌される。このトランスジェニック非ヒト哺乳動物も本願の発明に属する。

該トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法(例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照)に従って作製することができる。

【0067】

具体的には、例えば、トランスジェニックマウスの場合には、正常マウス胚盤胞(blastcyst)のから取得した胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell, ES Cell)を、本発明のヒトAID蛋白をコードする遺伝子及びマーカー遺伝子(例えば、ネオマイシン耐性遺伝子)が発現可能なように挿入された発現ベクターで形質転換する。該本発明のヒトAID蛋白をコードする遺伝子が内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞を、マーカー遺伝子の発現の有無に基づいて常法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵(胚盤胞)にマイクロインジェクションする(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980; 米国特許第4,873,191号公報)。

該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そして該仮親マウスから、ファウンダーマウス(子マウス)が生まれる。該ファウンダーマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ(heterogeneous)トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ(homogeneous)トランスジェニックマウスが得

られる。

【0068】

また、本発明に包含されるマウスAID蛋白をコードするDNAの塩基配列に基づいて、いわゆる「ノックアウトマウス」を作製することができる。本発明における「ノックアウトマウス」とは、本発明のマウスAID蛋白をコードする内在性遺伝子がノックアウト（不活性化）されたマウスであり、例えば相同組換えを応用したポジティブネガティブセレクション法（米国特許第5,464,764号公報、同5,487,992号公報、同5,627,059号公報、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 8932-8935, 1989、Nature, Vol. 342, 435-438, 1989など）を用いて作製することができ、このようなノックアウトマウスも本発明の一態様である。

【0069】

本発明における「抗体」とは、ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、前述の本発明のタンパクまたはその断片（フラグメント）に反応性を有する抗体である。

本発明の「抗体」は、本発明のタンパク（天然体、組換体、合成物、細胞等）若しくはその断片、あるいは前述のような遺伝子組換技術により目的タンパクを高発現する形質転換体を、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

またモノクローナル抗体の場合には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMである。

【0070】

本発明で言うポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュvant（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、

イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髄腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を产生するクローンを選択することによって製造される。

【0071】

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような本発明のタンパク若しくはその断片あるいは該タンパクを発現している細胞等を免疫原として、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（ヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を产生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。

【0072】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature, Vol.256, p.495-497, 1975）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

【0073】

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ

P3/X63-AG8.653 (653 ; ATCC №.CRL1580) 、 P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1) 、 P3/X63-Ag8.U1 (P3U1) 、 SP2/0-Ag14 (Sp2/0、 Sp2) 、 PAI、 F0ある いはBW5147、 ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、 ヒト由来ミエローマU-266AR1、 GM1500-6TG-A1-2、 UC729-6、 CEM-AGR、 D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、 例えばマイクロタイタープレート中で培養し、 増殖の見られたウェルの培養上清の前述のマウス免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、 例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

【0074】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、 ハイブリドーマをインビトロ、 またはマウス、 ラット、 モルモット、 ハムスターまたはウサギ等、 好ましくはマウスまたはラット、 より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、 得られた培養上清、 または哺乳動物の腹水から単離することにより行なうことができる。

インビトロで培養する場合には、 培養する細胞種の特性、 試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、 ハイブリドーマを増殖、 維持及び保存させ、 培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0075】

基本培地としては、 例えば、 Ham' F12培地、 MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、 MEM培地、 D-MEM培地、 RPMI1640培地、 ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、 該基本培地は、 目的に応じて、 例えば血清、 ホルモン、 サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。

モノクローナル抗体の単離、 精製は、 上述の培養上清あるいは腹水を、 飽和硫酸アンモニウム、 ユーグロブリン沈澱法、 カプロイン酸法、 カプリル酸法、 イオン交換クロマトグラフィー (DEAEまたはDE52等) 、 抗イムノグロブリンカラムあ

るいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

【0076】

また、当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、トランスジェニック動物作製技術を用いて当該抗体コーディング遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウ、ヤギ、ヒツジまたはブタを作製し、当該トランスジェニック動物のミルク中から当該抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

【0077】

本発明における「キメラ抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その可変領域がマウスイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換キメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

【0078】

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV_H遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒ

トイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC_H遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV_L遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC_L遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各自発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

【0079】

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、HindIII等）を用いて消化し、電気泳動（例えば0.7%アガロースゲル使用）に付してサザンプロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムプロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカーの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25M HCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ペイキング（75°C、3時間）を行う。ペイキング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65°Cで30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65°Cで3~4時間処理する。

【0080】

次に、この中に³²P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65°Cで12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC/0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

【0081】

上記サザンプロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各自コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したD

NA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、 λ EMBL3、 λ EMBL4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適當なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（ κ ）J遺伝子等）を用いて、例えばペントンディビス法（Science, Vol.196, p.180-182, 1977）に従って、ブラークハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV_H(VDJ)遺伝子あるいはV_L(VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

【0082】

一方、キメラ化に用いるヒトC_H遺伝子及びヒトC_L遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、C_H遺伝子であるC γ ₁遺伝子とC_L遺伝子であるC κ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトC γ ₁遺伝子及びヒトC κ 遺伝子に相当するマウスC γ ₁遺伝子及びマウスC κ 遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

【0083】

具体的には、例えば、クローンIg146 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.75, p.4709-4713, 1978) からの3kbのHindIII-BamHI断片とクローンMEP10 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.78, p.474-478, 1981) からの6.8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4A のHaeIII-AluIゲノムライブラリー (Cell, Vol.15, p.1157-1174, 1978) 中から、ヒトC κ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC γ ₁遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9kbのバンドを λ 788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

【0084】

このようにして単離されたマウスV_H遺伝子とマウスV_L遺伝子、及びヒトC_H

遺伝子とヒト C_L 遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウス V_H 遺伝子の下流にヒト C_H 遺伝子を、またマウス V_L 遺伝子の下流にヒト C_L 遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばpSV2gptあるいはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウス V_H 遺伝子/ヒト C_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子/ヒト C_L 遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

【0085】

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63·Ag8·653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を產生していない骨髄腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体產生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体產生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

【0086】

本発明における「ヒト型抗体（CDR-grafted抗体）」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部がマウスモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

【0087】

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域（Complementarity-determining residue；CDR1、CDR2、CDR3）を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域（Framework；FR1、FR2、FR3、FR4）を指す。

換言すれば、例えばマウスモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグログリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の構成領域についても限定されるものではない。

【0088】

本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換ヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参考して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

【0089】

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子/ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子/ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノ

クローナル抗体產生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

【0090】

本発明における「ヒト抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

ヒト抗体は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。例えば、ヒト抗体を產生するトランスジェニックマウスは、既報(Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; 表平4-504365号公報; 国際出願公開W094/25585号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平6-500233号公報)に記載の方法に従って作製することができる。

【0091】

本発明における「抗体の一部」とは、前述の本発明における抗体、好ましくはモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab、Fv (variable fragment of antibody)、sFv、dsFv (disulphide stabilised Fv) あるいはdAb (single domain antibody) である (Exp. Opin. Ther. Patents, Vol.6, No.5, p.441-456, 1996)。

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン(モノクローナル抗体)を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて V_L (L鎖可変領域)と C_L (L鎖定常領域)からなるL鎖、及び V_H (H鎖可変領域)と $C_H\gamma 1$ (H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域)とからなるH鎖フラグ

メントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同的な抗体フラグメントを各々Fa_{b'}という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

【0092】

本発明の「タンパクまたはその断片に反応性を有するモノクローナル抗体を產生する細胞」とは、前述した本発明のモノクローナル抗体を產生する任意の細胞を意味する。

具体的には、下記が包含される。

(1) 前述したとおりの、本発明のタンパク、その断片または該タンパクを產生する細胞等で非ヒト哺乳動物を免疫して得られる本発明のタンパクまたはその一部に反応性を有するモノクローナル抗体を產生する該非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体產生B細胞。

(2) そのようにして得られた抗体產生B細胞を哺乳動物由来のミエローマ細胞と細胞融合して得られる前述のハイブリドーマ(融合細胞)。

(3) 該モノクローナル抗体產生B細胞またはモノクローナル抗体產生ハイブリドーマから単離される該モノクローナル抗体をコードする遺伝子(重鎖をコードする遺伝子若しくは軽鎖をコードする遺伝子のいずれか一方、または両方の遺伝子)により該B細胞及びハイブリドーマ以外の細胞を形質転換して得られるモノクローナル抗体產生形質転換細胞のいずれかを意味する。

ここで、前記(3)に記載のモノクローナル抗体產生形質転換細胞は、即ち、前記(1)のB細胞または(2)のハイブリドーマが產生するモノクローナル抗体の遺伝子組換え体を產生する遺伝子組換え細胞を意味する。この組換えモノクローナル抗体產生細胞は、前述したキメラモノクローナル抗体及びヒト型抗体の製造において使用される方法と同様にして製造することができる。

【0093】

本発明の「医薬組成物」とは、前記で定義される本発明のタンパク若しくはそ

の断片（フラグメント）、抗体または該抗体の一部のいずれかと、薬学的に許容され得る担体とからなる医薬組成物である。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、增量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

【0094】

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記タンパクや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\text{ }\mu\text{g}$ から 1000mg （あるいは $10\text{ }\mu\text{g}$ から 500mg ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1\text{ }\mu\text{g}$ 抗体／ml担体～ 10mg 抗体／ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において 1 kg 体重あたり、 $1\text{ }\mu\text{g}$ ～ 100mg の割合で、好ましくは $50\text{ }\mu\text{g}$ ～ 50mg の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

【0095】

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなア

ルコール類など)、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、例えばB細胞の機能不全(例えば、IgA欠損症、IgA腎症、 γ グロブリン血症、高IgM血症など)あるいは免疫グロブリンのクラススイッチの不全に起因する種々の免疫不全症の予防並びに治療する医薬品として有用である。

【0096】

【実施例】

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0097】

実施例1 マウスB細胞クローニングCH12F3-2の培養及び性状の確認

本発明者らによって以前単離したIL-4、TGF- β 及びCD40Lによる刺激の数時間後にIgMからIgAへのクラススイッチ組換え(CSR)を起こすマウスB細胞クローニングCH12F3-2を既報と同様にして培養した(Immunity, Vol.9, p.1-10, 1998; Curr. Biol., Vol.8, No.4, p.227-230, 1998; Int. Immunol., Vol.8, No.2, p.193-201, 1996)。

該細胞CH12F3-2をIL-4、TGF- β 及びCD40Lで刺激すると、刺激の数時間後にクラススイッチ組換えによりループアウトされるS領域(スイッチ領域)を含む環状DNAが検出される。

既報(Curr. Biol., Vol.8, No.4, p.227-230, 1998)と同様にして以下の操作を行った。

【0098】

IL-4、TGF- β 及びCD40Lで刺激した該B細胞CH12F3-2及び未刺激の該細胞の各々を、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド(cycloheximide; 200ng/ml)の

存在下または非存在下で6時間培養した。各々の細胞から、DNAを抽出し、該DNAを鑄型として常法に従ってPCRを行い、S μ 配列及びS α 配列を含む環状DNAを増幅した。PCRは、一対のプライマー α F1及び μ R3を用いたPCR、並びに一対のプライマー α F1及び μ R3を用いたPCRを行った。

また、対照としてGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をコードするゲノムDNAも同様にPCRにより増幅した。

PCR産物を、エチジウムプロマイド染色によるゲル電気泳動に供した。この結果を図1(a)に示す。

【0099】

また、ループアウトされたS領域を含む環状DNAの増幅の有無を確認するため、マウスS α 領域遺伝子をハイブリダイゼーションプローブとして用い、常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) に従って該PCR産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行った。なお、該S α 遺伝子は、10kbのEcoRI切断断片IgH703をHindIII及びEarIで切断して得られる1,155bpのDNA断片を用いた (Genbank #D11468, DNA番号1993-3148) (J. Biol. Chem., Vol.268, p.4651-4655)。結果を図1(b)に示す。

マウスB細胞CH12F3-2は、サイトカインの刺激によりクラススイッチ組換えに伴うS α 配列を含むループアウトされたDNAが生じ、また該DNAの産生はシクロヘキシミドの存在により阻害されることが示された。このことから、免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換えが起こるためには、刺激の後の非常に早い段階での蛋白の産生増強が必要であり、該蛋白がクラススイッチの誘導に深く関与するものと推測された。

【0100】

実施例2 サイトカイン刺激したマウスB細胞クローニングCH12F3-2で発現が増強される遺伝子の同定

マウスB細胞クローニングCH12F3-2を刺激後の初期に発現し、免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換えの誘導を担うことが推測される遺伝子の該CH12F3-2細胞からの単離を、抑制PCR効果 (Nucleic Acids Res., Vol.23, p.1087-1088, 19

95) を利用したサプレッションサブトラクトハイブリダイゼーション法 (suppression subtract hybridization (SSH)) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.93, p.6025-6030, 1996; Anal. Biochem., Vol.240, p.90-97, 1996) により試みた。

【0101】

実験操作は、サブトラクションクローニングに必要なcDNAライブラリーの調製は、PCR-Select Subtraction Kit (CLONTECH製、カタログ番号：K1804-1) を用い、該キットに添付の実験操作手順書に従って行った。

IL-4、TGF- β 及びCD40Lで5時間刺激したマウスB細胞クローニングCH12F3-2、同サイトカインで12時間刺激した同細胞、並びに未刺激の同細胞の各々から、既報 (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998) と同様にしてpolyA⁺RNAを単離し、次いで、DNaseIで処理して混入しているかもしれないゲノムDNAを除去した。次いで、各々のpolyA⁺RNA試料を基に逆転写酵素を用い常法に従ってcDNAを調製した。前記サイトカインで各々5時間または12時間刺激したマウスB細胞クローニングCH12F3-2から調製した各々のcDNAを各々当モル量で混合しテスターcDNA (tester cDNA) として用いた。一方、未刺激の細胞由来のcDNAをドライバーコンピューター (driver cDNA) として用いた。

【0102】

前記既報及び該実験操作マニュアルに従って、テスターcDNAにドライバーコンピューターを加えサブトラクションを行った。なお、サブトラクションの効率は、テスターcDNAに、コントロールとして制限酵素HaeIIIで切断した ϕ X174ファージDNAを少量 (1:1000のモル率) 加えることによりモニターした。サブトラクションの後、該ファージDNAをモル率で約100倍に濃縮した。

サブトラクションされたcDNA (subtracted cDNA) を、常法に従ってT-ベクター (Promega製) 中にクローニングしプラスミドライブラリーを作製した。既報と同様にして、該ライブラリーの2,000コロニーを、ディファレンシャルハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998; 臨床免疫, Vol.29, No. Suppl.17, p.451-459, 1997)。なお、前記テスターcDNA及びドライバーコンピューターの各々を放射性標識しハイブリダ

イゼーションプローブとして用いた。なお、レプリカントフルターに ϕ X174ファージDNAをハイブリダイズさせることにより、 ϕ X174ファージDNAを含むクローンを区別した。

【0103】

放射性標識ドライバーcDNAプローブよりも放射性標識テスターcDNAプローブに對してより強いシグナルを発する115クローンを同定し、各々のクローンの塩基配列をDNAシークエンサーを用いて決定した。

該各々のクローンに挿入されているDNAの放射性標識体をプローブとして用い、 IL-4、 TGF- β 及びCD40Lで刺激したマウスB細胞クローンCH12F3-2から取得したmRNAに対して常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) によりノーザンプロットティングを行った。その結果、115クローンの内の23クローンが陽性であった。前記で決定した塩基配列情報から、該23クローンには、各々下記の3種類の既知蛋白をコードする遺伝子と4種類の未知蛋白をコードする遺伝子を含む7種類の別々の蛋白をコードする遺伝子の断片が挿入されていた。即ち、マウスB細胞クローンCH12F3-2では、IL-4、TGF- β 及びCD40Lによる刺激により該7種類の遺伝子の発現が増強されることが分かった。

【0104】

<既知蛋白>

- (1) ABCD-1/MDC (8クローン)
- (2) IFN γ 受容体 (2クローン)
- (3) I-a (MHC class II) (1クローン)

<未知蛋白>

- (1) 23C9 (3クローン)
- (2) 15B11 (7クローン)
- (3) 8B9 (1クローン)
- (4) 16A9 (1クローン)

【0105】

これまでの報告から、脾臓B細胞をIL-4及びCD40Lで刺激すると前記I-a遺伝子

及びABCD/MDC遺伝子の発現が増強されることが知られていることから、本サブトラクションクローニングが有効に行われたことが確認された (J. Exp. Med., Vol. 188, No. 3, p. 451-463, 1998; Immunity, Vol. 5, No. 4, p. 319-330, 1996)。

【0106】

実施例3 未知蛋白23C9のmRNAのマウスB細胞クローンCH12F3-2中の発現

IL-4、TGF- β 及びCD40Lで刺激したマウスB細胞クローンCH12F3-2中の未知蛋白23C9をコードする遺伝子の発現の増強の程度を、常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) に従ってノーザンプロッティングにより解析した。

マウスB細胞クローンCH12F3-2を、下記のいずれかの試薬の存在下で12時間培養した。

- (1) IL-4、TGF- β 及びCD40Lのみ。
- (2) 蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド (200ng/ml) のみ。
- (3) IL-4、TGF- β 及びCD40L並びにシクロヘキシミド (200ng/ml)。

【0107】

次いで、前記実施例で取得した未知蛋白23C9をコードするcDNA断片 (1,020bp) の放射性標識体をプローブとして用い、各々の処理細胞群から既報 (Nucleic Acids Res., Vol. 26, No. 4, p. 911-918, 1998) と同様にして取得したmRNA (各群10 μ g) に対して常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) によりノーザンプロッティングを行った。

【0108】

対照試験として、前記いずれのサイトカイン及びシクロヘキシミドも加えないで培養したマウスB細胞クローンCH12F3-2由来のmRNAについても同様にノーザンプロッティングを行った。

なお、ゲル電気泳動するmRNAの量は、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のmRNAを指標にして補正した。GAPDH mRNAのプロッティングのためのプローブは、GFプライマー及びGRプライマー (キノシタ製) を用いたRT-PCRにより増幅されたDNAを用いた (塩基位置: 566-1016, Genbank U52599) (Immun

ity, Vol.9, p.1-10, 1998)。

結果を図2に示す。

未知蛋白23C9のmRNAの発現は、IL-4、TGF- β 及びCD40Lで刺激したマウスB細胞クローニングCH12F3-2で非常に多く、一方、未刺激の細胞での発現は極めて弱かった。また、該刺激細胞でのmRNAの発現は、蛋白合成阻害剤の存在によって阻害された。また、該刺激細胞では、各々別々の長さの塩基長を有するmRNAの発現を示す2つのバンドが検出された。

【0109】

前記と同様のノーザンプロットティングにより、元来クラススイッチ組換えをする機能を有していない下記の種々の細胞株での未知蛋白23C9のmRNAの発現を調べた。

B細胞株 (LyD9、BA/F3、70Z/3、WEHI231)、ミエローマ細胞株 (X63、WEHI-3)。纖維芽細胞株 (L929、NIH3T3)、他の細胞株 (EL-4、2B4、F2、P815、ST2)。

しかしながら、いずれの細胞においても未知蛋白23C9のmRNAの発現は見られなかった。

【0110】

実施例4 未知蛋白23C9をコードする全長cDNAのクローニング

前記実施例で取得した未知蛋白23C9をコードするcDNA断片 (1,020bp) をプローブとして用い、IL-4、TGF- β 及びCD40Lで刺激したマウスB細胞クローニングCH12F3-2から作製したcDNAライブラリー (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998) をスクリーニングして、4つの別々の陽性クローニングを取得した。各々のクローニング中のDNAの塩基配列を、常法に従って、DNAシークエンサーを用いて決定した。

1つのクローニングは、1.2kbの塩基長を有し、また1つのポリアデニレーション部位を有する単一の読み取り枠 (open reading frame; ORF) を有していた。他の3つのクローニングは、2.4kbの塩基長を有し、2つのポリアデニレーション部位を有していた。後者のクローニングの5'側の1.2kbの部分の塩基配列は、前者の1.2kbのDNAの塩基と同一であった (配列番号1)。

【0111】

前記実施例3のノーザンプロッティングで検出された、異なる2つのmRNA転写物（図2）は、各々3'側のpolyA部位及び5'側のpolyA部位を用いて転写された前記1.2kb及び2.4kbの各々のcDNAの転写物に対応するものと思われた。なお、前記でプローブとして用いた未知蛋白23C9をコードするcDNA断片（1,020bp）は、23C9の全長cDNAの847乃至1866番目の塩基配列であることが分かった。

各々のcDNAにおける最初の開始コドンの近傍の塩基配列は、コザックのルール（Kozak's rule）（Nucleic Acids Res., Vol.15, No.20, p.8125-8148, 1987）に適合していた。また、該2.4kbのcDNAには、3'側の非翻訳領域中に、mRNAの急速な分解を媒介することができるモチーフであるATTAA（Blood, Vol.83, No.11, p.3182-3187, 1994）が2箇所存在していた。

【0112】

該未知蛋白23C9をコードするcDNAのORFは、分子量が約24kDaと算出される198個のアミノ酸から構成されていた（配列番号2）。データベースを用いた既知蛋白とのホモロジー検索の結果、未知蛋白23C9のORFのアミノ酸配列は、APOBEC-1（apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-1）と34%のアミノ酸同一性を有していた（Science, Vol.260, No.5115, p.1816-1819, 1993; J. Biol. Chem., Vol.268, No.28, p.20709-20712, 1993）。なお、DNAデータベースとして、GenBank及びEMBLを利用した。蛋白データベースとしては、SwissPlotを利用した。また、データベース検索は、BLASTプログラム（J. Mol. Biol., Vol.215, No.3, p.403-410, 1990）及びFASTAプログラム（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.85, No.8, p.2444-2448, 1988）を用いて行った。配列の比較は、GENETYX MAC9.0を用いて行った。

【0113】

該未知蛋白23C9のORFのアミノ酸配列並びに該配列とマウスAPOBEC-1のアミノ酸配列とのアラインメント（alignment）を図3に示す。

Prosite（Nucleic Acids Res., Vol.11, No.20, p.2013-2018, 1992）を用いてオンライン上でモチーフ検索を行った結果、該APOBEC-1様未知蛋白23C9は、大きなファミリーを形成するシトシン ヌクレオシド／ヌクレオチド デアミナーゼ

ファミリー (cytosine nucleoside/nucleotide deaminase family) に属する蛋白のアミノ酸配列中に保存されておりデアミナーゼ活性の活性部位であるシチジンデアミナーゼモチーフ (cytidine deaminase motif) 及びデオキシシチジンデアミナーゼモチーフ (deoxycytidine deaminase motif) を有していた。シトシン ヌクレオシド/ヌクレオチド デアミナーゼ ファミリーは、基質特異性及び活性部位の配列の相同性に基づいて、RNA編集デアミナーゼ (RNA editing deaminase)、シチジン/デオキシシチジレートデアミナーゼ (cytidine/deoxycytidylate deaminase)、及びCMP/dCMPデアミナーゼに分類される (Cell, Vol.81, No. 2, p.187-195, 1995)。

【0114】

UPGMA法により、RNA編集デアミナーゼであるAPOBEC-1、シトシンヌクレオシドデアミナーゼ、シトシンヌクレオチドデアミナーゼ、及び該未知蛋白23C9のシチジンデアミナーゼモチーフの領域のアラインメント (alignment) を基に系統樹 (phylogenetic tree) を作成した。なお、比較に用いた既知蛋白の配列は下記のとおりGenBankより入手した。

ヒト由来ヌクレオシドデアミナーゼ： L27943

マウス由来ヌクレオシドデアミナーゼ： AA388666

S. *subtilis*由来ヌクレオシドデアミナーゼ： U18532

E. *coli*由来シチジンデアミナーゼ： X63144

ウサギ由来APOBEC-1： U10695

ヒト由来APOBEC-1： L25877

ラット由来APOBEC-1： U10695

マウス由来APOBEC-1： U21951

T2/T4ファージ由来ヌクレオチドデアミナーゼ： J05172

ヒト由来ヌクレオチドデアミナーゼ： L12136

S. *cerevisies*由来ヌクレオチドデアミナーゼ： U10397

【0115】

結果を図4に示す。未知蛋白23C9のシチジンデアミナーゼモチーフは、ヌクレオシドデアミナーゼ及びヌクレオチドデアミナーゼのサブグループより寧ろRNA

編集デアミナーゼのサブグループに近縁であった。

一方、APOBEC-1のC末端側に存在するロイシンに富んだ領域 (Leucine-rich region) は、蛋白と蛋白との相互作用に重要であると考えられている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 91, No. 18, p. 8522-8526, 1994; J. Biol. Chem., Vol. 269, No. 34, p. 21725-21734, 1994)。該未知蛋白23C9も、そのC末端側にロイシンに富んだ領域 (Leucine-rich region) を有していた。また、23C9の該領域中の4つのロイシンは、ウサギ、ラット、マウス及びヒトのAPOBEC-1のLeucine-rich region中に保存されていた。

【0116】

また、APOBEC-1のRNAへの結合には、Phe66、Phe87、His61、Glu63及びCys93が必須であることが知られているが、これら全てのアミノ酸残基が23C9蛋白の一次構造中に保存されていた (Trends Genet., Vol. 12, No. 10, p. 418-424, 1996; Cell, Vol. 81, No. 2, p. 187-195, 1995; J. Biol. Chem., Vol. 270, No. 24, p. 14768-14775, 1995; J. Biol. Chem., Vol. 270, No. 24, p. 14762-14767, 1995)。この事実から23C9蛋白は、RNA編集デアミナーゼ活性を有することが推察される。

【0117】

さらに、APOBEC-1及びE.coli由来のシチジンデアミナーゼ (ECCDA) は、それらのC末端側に、ホモダイマーを形成するための偽活性化部位ドメイン (pseudooctive site domain) を有することが知られているが、該23C9蛋白もAPOBEC-1と同様の偽活性化部位ドメインを有していた。これは、23C9蛋白が、ホモダイマーを形成する可能性、または他の補助蛋白と会合する可能性を示唆するものである。

これらの事実から、該未知蛋白23C9を、AID (activation-induced cytidine deaminase) と命名した。以下未知蛋白23C9をAIDと称する。

【0118】

実施例5 AID-GST融合蛋白の調製

前記実施例でクローニングしたAIDの全長をコードするcDNAを、一対のプライマーAID-138 (配列番号3) 及びAID-161 (配列番号4)、一対のプライマーAID-1

18（配列番号5）及びAID-119（配列番号6）、並びにTaqポリメラーゼを用いたPCRにより常法に従って増幅した。AID-118とAID-119の間にはイントロンが存在するため、AIDゲノミックDNA配列に由来するPCR産物を容易に分別することができる。

得られたPCR産物を、常法に従ってpGEX4T1ベクター（Pharmacia製）中にサブクローニングした。ベクターの塩基配列を決定し、該ベクター中にクローニングされた全長AIDcDNAの塩基配列中にTaqポリメラーゼの使用に由来する点変異が存在しないことを確認した。

【0119】

常法に従って、該ベクターで大腸菌DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体を培養し、全長AID cDNAを、GST（glutathione S-transferase）との融合蛋白として発現させた。AID-GST融合蛋白を、既報と同様にして、抽出した後、グルタチオンアガロースアフィニティクロマトグラフィー（glutathione agarose affinity chromatography）を用いて精製した（J. Biol. Chem., Vol.270, No.24, p.14768-14775, 1995）。

精製AID-GST融合蛋白の分子量を、常法に従って、10% SDS-PAGE及び銀染色法（silver staining）により分析した。なお、野生型の大腸菌DH5 α から抽出した蛋白を対照として用いた。結果を図5に示す。

予期したとおり、約49kDaの分子量を有するバンドが検出された。該約49kDaの下方に検出されたマイナーバンドは、一般的に精製過程で頻繁に生ずる蛋白分分解物であると考えられた。

【0120】

実施例6 AID蛋白のシチジンデアミナーゼ活性

AIDのシチジンデアミナーゼ活性を、既報と同様にして測定した（J. Biol. Chem., Vol.270, No.24, p.14768-14775, 1995）。

前記で調製した精製AID-GST融合蛋白（2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 100, 200, 300, 400, 及び600ng）を、3.3 μ Ciの $[^3\text{H}]$ デオキシシチジン（24.8Ci/mmol, DuPont製）及び250 μ Mシチジンとともに45mMのTrisを含む緩衝液（pH7.5、総量10 μ l

) 中で2乃至4時間インキュベーションした。次いで、デオキシシチジン(10 μ g/mlで2 μ l)及びデオキシリジン(10 μ g/mlで2 μ l)を加えて反応を止めた。次いで、遠心分離により不溶性物質を除いた後、反応混合物(4 μ l)をポリエチレンイミンーセルロース薄層クロマトグラフィープレート(VWR製)に供した。プレートを、イソプロピルアルコール/10%HCl(7:2 v/v)中で展開させた。プレートを、紫外線(254nm)に曝して視覚化し、デオキシシチジン及びデオキシリジンに対応するバンドをかき集めUltima Goldシンチレーション液中に加え、液体シンチレーション分光計(Packard製)で定量した。

結果を、図6に示す。この結果、AID蛋白は、濃度依存的なシチジンデアミナーゼ活性を示した。

【0121】

また、AID-GST融合蛋白(300ng)のシチジンデアミナーゼ活性の、シチジンデアミナーゼの特異的阻害剤であるテトラヒドロウリジン(tetrahydouridine, THU; 0乃至40 μ M)(Calbiochem製、USA)による阻害効果を、前記と同様にして測定した。

結果を、図7に示す。AID蛋白のシチジンデアミナーゼ活性は、THUの濃度に依存して阻害された。

また、AID-GST融合蛋白(300ng)のシチジンデアミナーゼ活性の、亜鉛キレート化剤である1,10-o-phenanthroline(0乃至20mM)及びその不活性型異性体である1,7-o-phenanthroline(0乃至20mM)各々による阻害効果を、前記と同様にして測定した。

結果を、図8に示す。AID蛋白のシチジンデアミナーゼ活性は、20mMの1,10-o-phenanthrolineにより約91%阻害された。不活性型異性体である1,7-o-phenanthrolineでは、約13%しか阻害されなかった。この結果、AID蛋白は、APOBEC-1と同様に亜鉛依存的シチジンデアミナーゼであることが示された。

【0122】

実施例7 AID蛋白のAU-rich RNAへの結合性

組換えAPOBEC-1は、AU-rich RNAに結合し(Trends Genet., Vol.12, No.10, p.418-424, 1996; Cell, Vol.81, No.2, p.187-195, 1995; J. Biol. Chem., Vol.

.270, No.24, p.14768-14775, 1995; J. Biol. Chem., Vol.270, No.24, p.14762-14767, 1995)、また補助因子を含むニワトリ抽出物の存在下でapoBのRNA編集を進行させる。

【0123】

AID蛋白は、APOBEC-1と構造的類似性を有するとともに機能的なシチジンデアミナーゼ活性を有することから、AID蛋白のRNA編集活性を調べるために、APOBEC-1のRNA基質であるAU-rich RNA (5-AU) 及びapoB RNAへの結合性を検討した。

ゲルリターデーションアッセイ (gel retardation assay) においては、AID蛋白は、AU-rich RNA (5-AU) に結合性を示さなかった。また、*in vitro* apoB RNAアッセイでは、C (シチジン) からU (ウリジン) への変換は見られなかった。

【0124】

実施例8 AID mRNAの組織での発現分布

AID mRNAの各種組織での発現を、ノーザンブロッティングにより常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989; 実験医学・別冊、「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社発行、p.133-140、1992年) に従って調べた。

試料としてのmRNAは、マウスの各種組織（筋肉、脾臓、肺、心臓、リンパ節、脳、腎臓、胸腺、精巣、肝臓）の各々に由来する細胞から既報 (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998) と同様にして取得したpolyA⁺RNA (各2 μg) を用いた。polyA⁺RNAのプロッティングのためのプローブは、前記実施例で取得したAID (23C9) をコードするcDNA断片 (1,020bp) の放射性標識体をプローブとして用いた。

なお、対照として、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のmRNAを同様にしてプロッティングした。GAPDH mRNAのプロッティングのためのプローブは、GFプライマー及びGRプライマー（キノシタ製）を用いたRT-PCRにより増幅されたDNAを用いた（塩基位置：566-1016、Genbank U52599）（Immunity, Vol.1.9, p.1-10, 1998）。

結果を図9に示す。

この結果、AID mRNAは、腸管膜リンパ節 (mesenteric lymphnode) で強い発現

が見られた。また、脾臓でも弱い発現が見られた。

【0125】

実施例9 AID mRNAの各種リンパ性組織での発現

AID mRNAの各種リンパ性組織での発現を、常法 (Imunity, Vol.9, p.1-10, 1998) に従ってRT-PCRにより解析した。

試料としてのmRNAは、マウスの各種リンパ性組織（ペイヤーズパッチ（Peyer's patch）、腸管膜リンパ節、腋窩リンパ節、脾臓、骨髓、胸腺）の各々に由来する細胞から既報 (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998) と同様にして取得したpolyA⁺RNAを錆型に、常法により逆転写酵素によりcDNAを調製した。得られたcDNAを錆型に、PCRによりAID cDNA及びGAPDH cDNAを増幅した。AID cDNAのPCRには、前述の一対のプライマーAID-138（配列番号3）及びAID-161（配列番号4）、一対のプライマーAID-118（配列番号5）及びAID-119（配列番号6）、並びにTaqポリメラーゼを用いた。AID-118とAID-119の間にはインtronが存在するため、AIDゲノミックDNA配列に由来するPCR産物を容易に分別することができる。

結果を図10に示す。

AID cDNAは、胸腺以外の全てのリンパ性組織で検出された。特に、リンパ節やペイヤーズパッチなどの末梢リンパ器官で顕著な発現が見られた。一方、一次性リンパ器官での発現は該末梢リンパ器官での発現と比べ低いものであった。

【0126】

実施例10 活性化マウスB細胞クローンCH12F3-2でのAID mRNAの経時的発現

IL-4、TGF- β 及びCD40Lで0乃至60時間刺激したマウスB細胞クローンCH12F3-2中のAID mRNAの経時的発現を、常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbor, 1989) に従ってノーザンプロッティングにより解析した。

マウスB細胞クローンCH12F3-2を、IL-4、TGF- β 及びCD40Lの存在下で各種時間（0, 3, 5, 12, 24, 36, 48または60時間）培養した。

次いで、前記実施例で取得したAID (23C9) をコードするcDNA断片 (1,020bp) の放射性標識体をプローブとして用い、各々の培養群から既報 (Nucleic Acids

Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998) と同様にして取得したmRNA (各群10 μg) に対して常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) によりノーザンブロッティングを行った。

【0127】

なお、ゲル電気泳動するmRNAの量は、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のmRNAを指標にして補正した。GAPDH mRNAのプロッティングのためのプローブは、GFプライマー及びGRプライマー (キノシタ製) を用いたRT-PCRにより増幅されたDNAを用いた (塩基位置: 566-1016, Genbank U52599) (Immunity, Vol.9, p.1-10, 1998)。

結果を図11に示す。

マウスB細胞クローンCH12F3-2でのAID mRNAの発現は、サイトカインによる刺激がない場合には検出不可能な程度であるが、サイトカイン (上述) の刺激により、刺激後約3時間で発現が始まり、約12時間後に最大の発現 (約15倍以上) に至り、48時間後から次第に減少することが示された。

【0128】

実施例11 マウスB細胞クローンCH12F3-2でのAID mRNAの発現誘導のサイトカイン特異性

マウスB細胞クローンCH12F3-2中でのAID mRNAの発現誘導のサイトカイン特異性を、常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) に従ってノーザンブロッティングにより解析した。

マウスB細胞クローンCH12F3-2を、各種組み合わせのサイトカイン (IL-4, TGF-β 及びCD40Lから選ばれる1以上) の存在下で12時間培養した。

次いで、前記実施例で取得したAID (23C9) をコードするcDNA断片 (1,020bp) の放射性標識体をプローブとして用い、各々の培養群から既報 (Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998) と同様にして取得したmRNA (各群10 μg) に対して常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) によりノーザ

ンプロッティングを行った。

【0129】

なお、ゲル電気泳動するmRNAの量は、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のmRNAを指標にして補正した。GAPDH mRNAのプロッティングのためのプローブは、GFプライマー及びGRプライマー（キノシタ製）を用いたRT-PCRにより増幅されたDNAを用いた（塩基位置：566-1016、Genbank U52599）（Immunity, Vol.9, p.1-10, 1998）。

結果を図12に示す。

AID-mRNAの発現誘導は、いずれか1種類のみのサイトカインでは小さなものであった。一方、上記上記3種類のサイトカインを同時に用いた場合には、AID-mRNAの最大の発現誘導が見られた。

前記実施例3で示したように、AID mRNAの発現誘導は蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシドにより阻害されることから、AID mRNAの発現増強には、蛋白のドユ・ノボ合成 (de novo synthesis) が必要であると考えられる。

【0130】

実施例12 刺激による脾臓B細胞でのAID mRNAの発現誘導

B細胞を活性化し免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換えを誘導するような刺激による脾臓B細胞でのAID mRNAの発現誘導の有無を検討した。

BALB/cマウス（6乃至12週齢、SLC製）から常法に従って脾臓B細胞を精製、取得した。なお、死細胞及び細胞断片は、T細胞除去の工程の後、フィコール密度勾配遠心法により除去した。該精製脾臓B細胞を、既報（Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998）と同様にして各種組み合わせの刺激物質（IL-4、TGF-β、CD40L及びLPS (lipopolysaccharide) から選ばれる1以上）の存在下で4日間培養した。なお、LPSは、*Salmonella typhosa*由来のLPS (50 μg/ml、Sigma製) を用いた。

【0131】

次いで、前記実施例で取得したAID (23C9) をコードするcDNA断片 (1,020bp) の放射性標識体をプローブとして用い、各々の培養群から既報（Nucleic Acids Res., Vol.26, No.4, p.911-918, 1998）と同様にして取得したmRNA (各群15 μg

) に対して常法 (L.Sambrook, E.F., Tom Maniatis., Second edition, Ed. Molecular Cloning (Nolan, C., Ed.), Cold Spring Harbour, 1989) によりノーザンプロットティングを行った。

なお、ゲル電気泳動するmRNAの量は、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のmRNA及び28S ribosomal RNAを指標にして補正した。GAPDH mRNAのプロットティングのためのプローブは、GFプライマー及びGRプライマー (キノシタ製) を用いたRT-PCRにより増幅されたDNAを用いた (塩基位置: 566-1016, Genbank U52599) (Immunity, Vol.9, p.1-10, 1998)。

結果を図13に示す。

正常マウス脾臓B細胞では、LPSのみ、LPS+IL-4、またはLPS+TGF- β による刺激によりAID mRNAの発現増強が見られた。

【0132】

実施例13 AID mRNAのin vivoでの発現誘導

各種刺激によるAID mRNAのin vitroでの発現誘導が、in vivoでも起こるか否かを試験した。

BALB/cマウス (6乃至12週齢、各群5匹、SLC製) を、羊赤血球 (SRBC; sheep red blood cell) (1×10^8 個、Cosmo Bio.製) を腹腔内投与することにより免疫した。羊赤血球を免疫された生体では、免疫応答に続いて、クローナル細胞増幅 (clonal expansion) 及び胚中心形成 (germinal center formation) が起き免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換え及びアフィニティーマチュレーションが引き起こされることが知られている。

【0133】

免疫前 (0日)、並びに免疫後 (2、5及び13日目) の各々に切除した脾臓 (各群5匹) から単離した脾臓細胞からpolyA⁺RNAを調製した。

該polyA⁺RNA (各2 μ g) を、前記実施例と同様にして、AID (23C9) をコードするcDNA断片 (1,020bp) の放射性標識体をプローブとして用いるノーザンプロットティングに供した。なお、ゲル電気泳動するmRNAの量は、前記実施例と同様にGAPDHのmRNAを指標にして補正した。

結果を図14に示す。

AID mRNAの発現は、SRBCの免疫前（0日）においては最低量しか検出されなかったが、免疫後5日目及び13日目においては有意な発現増強（約4乃至5倍）が見られた。

【0134】

さらに、SRBCで免疫されたマウス脾臓細胞の内のどの細胞種でAID mRNAの発現増強が起こっているのかを、常法（Imunity, Vol.9, p.1-10, 1998）に従ってRT-PCRを用いて解析した。

上述と同様にしてSRBCの免疫から5日後に取得した脾臓から取得した脾臓細胞から、常法により赤血球を除いた後、既報（Eur. J. Immunol., Vol.3, No.10, p.645-649, 1973）と同様にしてナイロン纖維（和光純薬製）を用いてT細胞と非T細胞に分けた。T細胞分画には、CD3陽性細胞が90%以上含まれており、またB220陽性細胞は20%以下であった。次いで、抗CD19抗体が接合させたマグネットイックビーズ（Miltenyi Biotec.製）を用いるMACS法により、T細胞分画の濃縮（B細胞の除去）並びにB細胞分画の濃縮を行った。CD19陽性細胞を除いた分画に含まれるB220陽性B細胞は5%以下であった。一方、CD19陽性細胞を濃縮した分画に含まれるB220陽性B細胞は60%以上であった。

【0135】

分画された各々の細胞群から調製したpolyA⁺RNAを鑄型に、常法により逆転写酵素によりcDNAを調製した。得られたcDNAを鑄型に、PCRによりAID cDNA及びGAP DH cDNAを増幅した。AID cDNAのPCRには、前述の一対のプライマーAID-138（配列番号3）及びAID-161（配列番号4）、一対のプライマーAID-118（配列番号5）及びAID-119（配列番号6）、並びにTaqポリメラーゼを用いた。

結果を図15に示す。

この結果、CD19陽性B細胞分画及び非T細胞分画において、AID cDNAの増幅が見られた。即ち、SRBCによる免疫により誘導されるAID mRNAの発現増強は、脾臓のCD19陽性B細胞で起こることが示された。

【0136】

実施例14 AID mRNAの発現のリンパ性器官における局在

前記実施例の結果から、脾臓におけるAID mRNAの発現の増強のタイミングは、

SRBCによる免疫後の胚中心 (germinal center; GC) の形成の開始とほぼ同時に起こることが分かった。本試験では、リンパ性器官でのAID mRNAの発現の正確な局在を *in situ hybridization* 法を用いて解析した。

AID蛋白をコードするcDNAがサブクローニングされているpGEX4T1ベクター（前記実施例）を、EcoRI及びXhoIで消化して切り出したAID cDNAを、プラスミドpBluescriptSK(+) (Stratagene製) 中にサブクローニングした。次いで、該プラスミドをEcoRIまたはXhoIで消化して得た線状化プラスミドDNAを鑄型とし、ジゴキシゲニン (digoxigenin) 標識rUTP (Boehringer-Mannheim製) の存在下で、T3 RNAポリメラーゼまたはT7 RNAポリメラーゼを用いてRNAへ転写し、ジゴキシゲニン標識したアンチセンスプローブ及びセンスプローブを各々調製した。

【0137】

一方、リンパ性器官標本として正常マウスの脾臓及びペイヤーズパッチの各々からパラホルムアルデヒドで固定化した凍結組織切片を調製した。また、前記実施例と同様に正常マウスをSRBCで免疫し、免疫後5日目に取得した脾臓からパラホルムアルデヒドで固定化した凍結組織切片を調製した。

各々の固定化切片を備えたスライドに該ジゴキシゲニン標識アンチセンスAIDプローブまたはセンスAIDプローブを加えてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズしたジゴキシゲニン標識AIDプローブを、アルカリンフォスファターゼを接合させた抗ジゴキシゲニン抗体を用いて検出した。プローブ上のジゴキシゲニンに結合した抗ジゴキシゲニン抗体の局在を、フォスファターゼ反応物（暗い紫様の色）を検出することにより同定した。なお、この解析は、光学顕微鏡 (light transmission microscope) を用いて行った。

【0138】

また、本試験における *in situ hybridization* 及びリボプローブ (riboprobe) の検出は、既報と同様にして行った (J. Comp. Neurol., Vol.333, No.3, p.398-416, 1993)。

各組織切片の胚中心の位置は、FITCを接合させたPNA (Vector製) で染色し、光学顕微鏡で観察して同定した。

結果を図16及び図17に示す。

アンチセンスAIDプローブを用いた試験においては、SRBC免疫マウス（免疫後5日目）由来の脾臓組織切片において複数の明瞭な焦点シグナル（focal signals）が観察されたが（図16(E)及び図17(E)）、SRBCにより免疫を施していないマウス由来の脾臓組織切片では、シグナルが検出されなかった（図16(B)及び図17(B)）。この結果は、前記実施例で得られたノーザンプロッティングの結果（図14）と一致していた。FITC標識PNAによる染色により、SRBC免疫マウス（免疫後5日目）由来の脾臓組織切片（図16(F)及び図17(F)）、並びに正常ペイヤーズパッチ（図17(I)）の両方ともに胚中心の存在が認められた。また、該両組織切片におけるAID mRNAの発現も、胚中心に局在していることが分かった。

なお、センスAIDプローブを用いた試験では、SRBCによる免疫の有無に拘らず、脾臓及びペイヤーズパッチのいずれの組織切片においてもバックグラウンドとしてのシグナルが検出されなかった。

この結果から、AID mRNAの発現誘導は、抗原による刺激により活性化されたB細胞を多く含んでいる胚中心で特異的に起こることが示された。

【0139】

【発明の効果】

本発明のAID蛋白は、種々の疾患を惹起する引き金となる非自己抗原（外来性抗原、自己反応性細胞など）を生体から排除するための抗原特異的免疫グロブリン（特異性抗体）の生成に必要な種々の生体メカニズムを制御する機能を有すると考えられる。さらに具体的には、抗原に高い特異性を有する免疫グロブリンの生成の特有のメカニズムである、B細胞の活性化、免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換え、体細胞超変異（somatic hypermutation）及びアフィニティーマチュレーション（affinity maturation）のような胚中心B細胞（germinal center B cells）で起こるRNA編集等の種々の遺伝子修飾（genetic editing）において重要な役割を担う酵素の一つと考えられる。

【0140】

従って、本発明のAID蛋白及びAID蛋白をコードする遺伝子の機能を制御することにより、例えばB細胞の機能不全（例えば、IgA欠損症、IgA腎症、 γ グロブリン血症、高IgM血症など）あるいは免疫グロブリンのクラススイッチの不全に起

因する種々の免疫不全症の予防並びに治療する医薬品開発のターゲットとなり得る。

即ち、本発明のAID蛋白及びその断片、AID蛋白をコードするDNA及びその断片、並びにAID蛋白に対する抗体は、そのような医薬品開発のための試薬として有用である。

【0141】

また、該DNAは、それ自体AID遺伝子の機能を遺伝子レベルで制御するアンチセンス医薬品として、また遺伝子治療での使用において有用である。該タンパクまたはその断片（例えば、酵素活性部位）は、その自体医薬品として有用である。

さらに本発明のAID蛋白に反応性を有する抗体またはその一部は、AID蛋白の機能を制御することによる抗体医薬品として極めて有用である。

さらに、本発明の遺伝子（DNA）、タンパク、及び抗体は、本発明のタンパク（酵素）と相互作用（結合）する基質（例えば、RNAなど）あるいは本発明のタンパクと会合する他の補助蛋白の探索、並びに該基質や補助蛋白をターゲットとした医薬品を開発するための試薬として有用である。

【0142】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco, Inc.

<120> Novel Cytidine Deaminase

<130> J1-101

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2440

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (93)..(689)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(92)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (690)..(2440)

<400> 1

ggcacgagca gcactgaagc agccttgctt gaagcaagct tcctttggcc taagactttg 60

aggagagtcaa gaaagtcacg ctggagaccg at atg gac agc ctt ctg atg aag 113

Met Asp Ser Leu Leu Met Lys

1

5

caa aag aag ttt ctt tac cat ttc aaa aat gtc cgc tgg gcc aag gga 161

Gln Lys Lys Phe Leu Tyr His Phe Lys Asn Val Arg Trp Ala Lys Gly

10

15

20

cgg cat gag acc tac ctc tgc tac gtg gtg aag agg aga gat agt gcc 209

Arg His Glu Thr Tyr Leu Cys Tyr Val Val Lys Arg Arg Asp Ser Ala

25

30

35

acc tcc tgc tca ctg gac ttc ggc cac ctt cgc aac aag tct ggc tgc 257

Thr Ser Cys Ser Leu Asp Phe Gly His Leu Arg Asn Lys Ser Gly Cys

40

45

50

55

cac gtg gaa ttg ttg ttc cta cgc tac atc tca gac tgg gac ctg gac 305

His Val Glu Leu Leu Phe Leu Arg Tyr Ile Ser Asp Trp Asp Leu Asp

60

65

70

ccg ggc cgg tgt tac cgc gtc acc tgg ttc acc tcc tgg agc ccg tgc 353

Pro Gly Arg Cys Tyr Arg Val Thr Trp Phe Thr Ser Trp Ser Pro Cys

75

80

85

tat gac tgt gcc cgg cac gtg gct gag ttt ctg aga tgg aac cct aac 401

Tyr Asp Cys Ala Arg His Val Ala Glu Phe Leu Arg Trp Asn Pro Asn

90

95

100

ctc agc ctg agg att ttc acc gcg cgc ctc tac ttc tgt gaa gac cgc 449

Leu Ser Leu Arg Ile Phe Thr Ala Arg Leu Tyr Phe Cys Glu Asp Arg

105

110

115

aag gct gag cct gag ggg ctg cgg aga ctg cac cgc gct ggg gtc cag 497

Lys Ala Glu Pro Glu Gly Leu Arg Arg Leu His Arg Ala Gly Val Gln

120

125

130

135

atc ggg atc atg acc ttc aaa gac tat ttt tac tgc tgg aat aca ttt 545

Ile Gly Ile Met Thr Phe Lys Asp Tyr Phe Tyr Cys Trp Asn Thr Phe

140

145

150

gta gaa aat cgt gaa aga act ttc aaa gcc tgg gaa ggg cta cat gaa 593

Val Glu Asn Arg Glu Arg Thr Phe Lys Ala Trp Glu Gly Leu His Glu

155

160

165

aat tct gtc cgg cta acc aga caa ctt cgg cgc atc ctt ttg ccc ttg 641

Asn Ser Val Arg Leu Thr Arg Gln Leu Arg Arg Ile Leu Leu Pro Leu

170

175

180

tac gaa gtc gat gac ttg cga gat gca ttt cgt atg ttg gga ttt tga 689

Tyr Glu Val Asp Asp Leu Arg Asp Ala Phe Arg Met Leu Gly Phe

185

190

195

aagcaacctc ctggaatgtc acacgtgatg aaatttctct gaagagactg gatagaaaaa 749

caacccttca actacatgtt tttcttctta agtactcaact tttataagtg tagggggaaa 809

ttatatgact ttttaaaaaa tacttgagct gcacaggacc gccagagcaa tgatgttaact 869

gagcttgctg tgcaacatcg ccatctactg gggAACAGCA taacttccag acTTGGTc 929

gtgaatgatg ctcttttt tcaacagcat ggAAAGCAT atggagacga ccacacagtt 989

tgttacaccc accctgtgtt ccttgattca tttgaattct caggggtatc agtgacggat 1049

tcttctattc ttccctcta aggctcactt tcaggggtcc tttctgaca aggtcacggg 1109

gctgtcctac agtctctgtc tgagcaatca caagccattc tctcaaaaac attaatactc 1169

aggcacatgc tgtatgtttt cactgtccgt cgtttttc acattttat gtgaaagggc 1229

ttggggtggg atttgaagaa tgcacgatcg cctctgggtg atttcaataa aggatcttaa 1289

aatgcagatg aggactacga agaaatcact ctgaaaatga gttcacgcct caagaagcaa 1349

atccccgttga aacacagact cttttcatt ttaatgtca ttagttact cacagtctta 1409

tcaagaagaa gagttcaagg gttcaaccca atttcagat cgcgtccctt aaacatcagt 1469

aattctgtta aaggatcaa acatccttat ttcttaacta actgggcct tgctgttagag 1529

aaaggagcaa agcgcccaga tccaaagtat atagttatca tagccagggaa ccgctactcg 1589

tttccattt caaatggcaa attttcccc gggctctcct catagtgcct gagacggacc 1649

acggaggtga tgaacctccg gattctctgg cccaacacgg tggaagctct gcaagggcgc 1709

agagacagaa tgcggcagaa attgcccccg agtcccaact ctccttcct tgcgaccttg 1769

ggaacaagac ttaaaggagc ctgtgactta gaaacttcta gtaatggta cctgggagtc 1829

gtttgagtagt gggcagtga ttattctct gtgatggatg ccaacacggt taaacagaat 1889

特平11-087192

tttagttt tatatgtgt tgatgctgct ccccaaatt gttaactgtg taagagggtg 1949

gcaaaaatagg gaaagtggca ttcacctata gttccagcat tcaggaagct gaggcaggag 2009

gattgtaaat ttgaggccag tctgagctgt aaggtgagac cctattcaa acaacacagc 2069

cagaattggg ttctggtaaa tcatacttaa caagggaaaa atgcaagacg caagaccgtg 2129

gcaaggaaat gacgcttgc ccaacgaaat gtaggaaacc aacatagact cccagttgt 2189

ccctcttat gtctggtctc cctaacaacg atcttgcta atgagaaaaa tattagaaaa 2249

aaatatccct gtgcaattat cacccagtcg ccattataat gcaattaaaa ggcccacaag 2309

aaatcctgta tacacgaccg ttatttattg tatgtaagtt gctgaggaag aggagaaaaa 2369

aataaagatc atccattcct tcctgcaaaa aaaaaaaaaa aaanaaaaaa aaaaaaaaaa 2429

aaaaaaaaaa a 2440

<210> 2

<211> 198

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 2

Met Asp Ser Leu Leu Met Lys Gln Lys Lys Phe Leu Tyr His Phe Lys

1

5

10

15

Asn Val Arg Trp Ala Lys Gly Arg His Glu Thr Tyr Leu Cys Tyr Val

20 25 30

Val Lys Arg Arg Asp Ser Ala Thr Ser Cys Ser Leu Asp Phe Gly His

35 40 45

Leu Arg Asn Lys Ser Gly Cys His Val Glu Leu Leu Phe Leu Arg Tyr

50 55 60

Ile Ser Asp Trp Asp Leu Asp Pro Gly Arg Cys Tyr Arg Val Thr Trp

65 70 75 80

Phe Thr Ser Trp Ser Pro Cys Tyr Asp Cys Ala Arg His Val Ala Glu

85 90 95

Phe Leu Arg Trp Asn Pro Asn Leu Ser Leu Arg Ile Phe Thr Ala Arg

100 105 110

Leu Tyr Phe Cys Glu Asp Arg Lys Ala Glu Pro Glu Gly Leu Arg Arg

115 120 125

Leu His Arg Ala Gly Val Gln Ile Gly Ile Met Thr Phe Lys Asp Tyr

130 135 140

Phe Tyr Cys Trp Asn Thr Phe Val Glu Asn Arg Glu Arg Thr Phe Lys

145 150 155 160

Ala Trp Glu Gly Leu His Glu Asn Ser Val Arg Leu Thr Arg Gln Leu

165

170

175

Arg Arg Ile Leu Leu Pro Leu Tyr Glu Val Asp Asp Leu Arg Asp Ala

180

185

190

Phe Arg Met Leu Gly Phe

195

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence, AID138

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<400> 3

ggaattcgcc atggacagcc ttctgatgaa

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence, AID161

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<400> 4

gccgctcgag tcaaaatccc aacatacgaa

30

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence, AID118

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<400> 5

ggctgagggtt agggttccat ctcag

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence, AID119

<400> 6

gagggagtca agaaagtcac gctgg

25

【0143】

「配列表フリーテキスト」

配列番号：3

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列AID138

配列番号：4

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列AID161

配列番号：5

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列AID118

配列番号：6

他の情報：人工配列についての記載：人工的に合成したプライマー配列AID119

【0144】

【図面の簡単な説明】

【図1】

各種条件で培養したマウスB細胞クローニングCH12F3-2におけるクラススイッチ組換えに伴いループアウトされるS α 配列を含むDNAの生成の状態を示す図。

分図(a)は、各種条件で培養したマウスB細胞クローニングCH12F3-2由来のDNAを鑄型としたPCRにより増幅したクラススイッチ組換えに伴いループアウトされるS α 配列を含むDNAのエチジウムプロマイド染色による電気泳動状態を示す図。

レーン1及びレーン6は、マーカーDNAの電気泳動状態を示す。レーン2は、IL-4、CD40L、TGF β 及びシクロヘキシミドのいずれも含まない条件下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物の電気泳動状態を示す。レーン3は、シクロヘキシミドのみの存在下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物の電気泳動状態を示す。レーン4は、IL-4、CD40L及びTGF β の存在下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物の電気泳動状態を示す。レーン5は、IL-4、CD40L、TGF β 及びシクロヘキシミドの存在下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物の電気泳動状態を示す。

分図(b)は、各種条件で培養したマウスB細胞クローニングCH12F3-2由来のDNAを鑄型としたPCRにより増幅したクラススイッチ組換えに伴いループアウトされるS α 配列を含むDNAのサザンハイブリダイゼーションによる結果を示す図。

レーン1は、IL-4、CD40L、TGF β 及びシクロヘキシミドのいずれも含まない条件下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物に対するハイブリダイゼーションの結果を示す。レーン2は、シクロヘキシミドのみの存在下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物に対するハイブリダイゼーションの結果を示す。レーン3は、IL-4、CD40L及びTGF β の存在下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物に対するハイブリダイゼーションの結果を示す。レーン4は、IL-4、CD40L、TGF β 及びシクロヘキシミドの存在下で培養した細胞のDNAを鑄型としたPCR産物に対するハイブリダイゼーションの結果を示す。

【図2】

各種条件で培養したマウスB細胞クローニングCH12F3-2由来のmRNAに対する、放射性標識した23C9 (AID)蛋白をコードするcDNA断片をプローブとしてノーザンプロットティングの結果を示す図。

レーン1は、IL-4、CD40L、TGF β 及びシクロヘキシミドのいずれも含まない条件下で培養した細胞のmRNAに対するプロットティングの結果を示す。レーン2は、シクロヘキシミドのみの存在下で培養した細胞のmRNAに対するプロットティングの結果を示す。レーン3は、IL-4、CD40L及びTGF β の存在下で培養した細胞のmRNAに対するプロットティングの結果を示す。レーン4は、IL-4、CD40L、TGF β 及びシクロヘキシミドの存在下で培養した細胞のmRNAに対するプロットティングの結果を示す。

【図3】

マウスAID蛋白とマウスAPOBEC-1の各々のアミノ酸配列の相同性を示す図。

黒い四角 (closed box) で囲まれたアミノ酸は、同一のアミノ酸が一致していることを示す。白抜きの四角 (open box) で囲まれた領域は、シチジンデアミナーゼモチーフを示す。アスタリスク (*) 及び矢印が付されたアミノ酸は、ラット、マウス、ウサギ及びヒト由来のAPOBEC-1蛋白のアミノ酸配列に保存されているアミノ酸であることを示す。

【図4】

シチジンデアミナーゼモチーフを基に作成したシトシン ヌクレオシド/ヌクレオチド デアミナーゼ ファミリーに属する種々酵素の系統樹を示す図。

【図5】

ゲル電気泳動及び銀染色法による分子量分析におけるAID-GST融合蛋白の電気泳動状態を示す図。

レーン1は、マーカー分子の電気泳動状態を示す。レーン2は、野生型大腸菌DH5 α からの抽出物に含まれる種々蛋白の電気泳動状態を示す。レーン3は、AID-GST融合蛋白の電気泳動状態を示す。

【図6】

AID蛋白の濃度依存的なシチジンデアミナーゼ活性を示す図。

【図7】

シチジンデアミナーゼの特異的阻害剤であるテトラヒドロウリジンによるAID蛋白のシチジンデアミナーゼ活性の阻害効果を示す図。

【図8】

亜鉛キレート剤である1,10-o-phenanthroline及びその不活性化異性体である1,7-o-phenanthrolineの各々によるAID蛋白のシチジンデアミナーゼ活性の阻害効果を示す図。

【図9】

ノーザンプロッティング法により分析したマウスの各種組織でのAIDのmRNAの発現状態を示す図。

【図10】

RT-PCRにより分析したマウスの各種リンパ性組織でのAIDのmRNAの発現状態を示す図。

【図11】

ノーザンプロッティング法により分析した活性化マウスB細胞クローニングCH12 F 3-2でのAIDのmRNAの経時的な発現状態を示す図。

【図12】

ノーザンプロッティング法により分析した種々組み合せのサイトカインで刺激したマウスB細胞クローニングCH12 F 3-2でのAIDのmRNAの発現状態を示す図。

【図13】

ノーザンプロッティング法により分析した種々組み合せの刺激物質で刺激したマウス脾臓B細胞でのAIDのmRNAの発現状態を示す図。

【図14】

ノーザンプロッティング法により分析した羊赤血球で免疫したマウス由来の脾臓細胞でのAIDのmRNAの発現状態を示す図。

【図15】

RT-PCRにより分析した羊赤血球で免疫したマウスの脾臓由来の各種細胞でのAIDのmRNAの発現状態を示す図。

【図16】

in situ hybridizationにより分析した正常マウス及び羊赤血球で免疫したマ

ウスの各々に由来する脾臓組織でのAID mRNAの発現の局在を示す図。

分図A及びDは、センスAIDプローブを用いたハイブリダイゼーションでの結果を示す。分図B及びEは、アンチセンスAIDプローブを用いたハイブリダイゼーションでのAID mRNAの発現の局在を示す。分図C及びFは、FITC標識PNAによる染色試験における胚中心の局在を示す。分図A、B及びCは、正常マウス由来（羊赤血球の免疫前）の脾臓組織を用いた試験での結果を示す。分図D、E及びFは、羊赤血球を免疫したマウスの免疫後5日目に作製した脾臓組織切片を用いた試験での結果を示す。

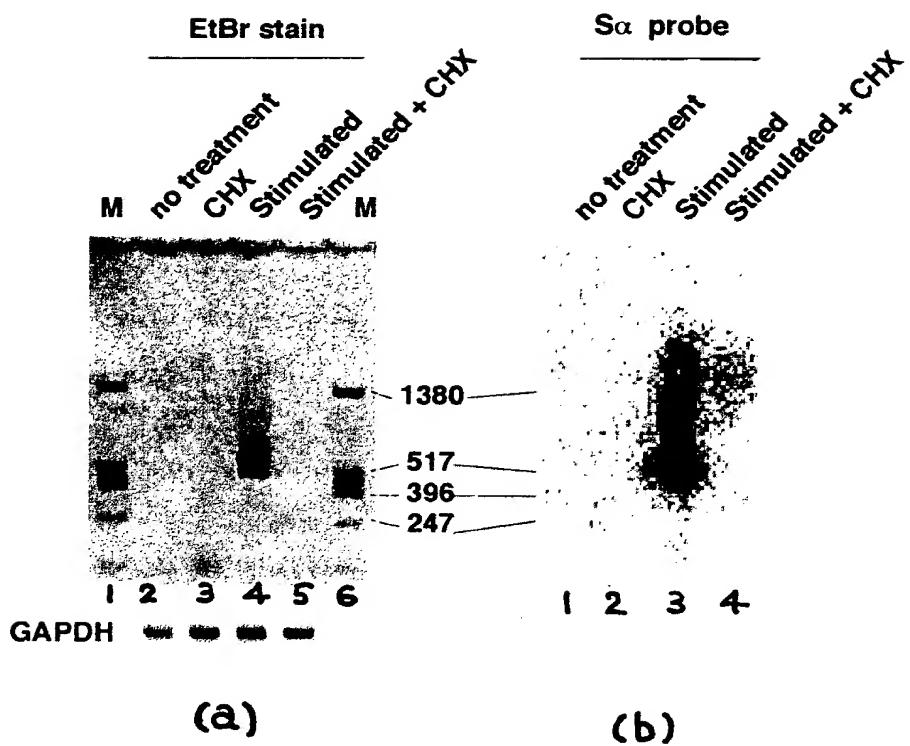
【図17】

*in situ hybridization*により分析した正常マウス及び羊赤血球で免疫したマウスの各々に由来する脾臓組織及びペイヤーズパッチ組織の各々でのAID mRNAの発現の局在を示す図。

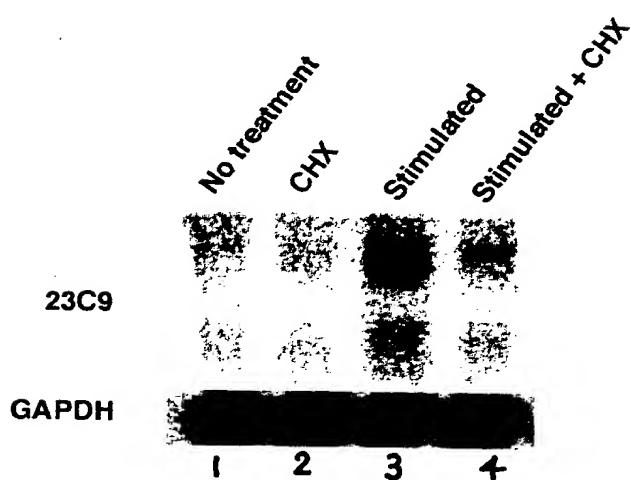
分図A、D及びGは、センスAIDプローブを用いたハイブリダイゼーションでの結果を示す。分図B、E及びHは、アンチセンスAIDプローブを用いたハイブリダイゼーションでのAID mRNAの発現の局在を示す。分図C、F及びIは、FITC標識PNAによる染色試験における胚中心の局在を示す。分図A、B及びCは、正常マウス由来（羊赤血球の免疫前）の脾臓組織を用いた試験での結果を示す。分図D、E及びFは、羊赤血球を免疫したマウスの免疫後5日目に作製した脾臓組織切片を用いた試験での結果を示す。分図G、H及びIは、羊赤血球を免疫したマウスの免疫後5日目に作製したペイヤーズパッチ組織切片を用いた試験での結果を示す。

【書類名】 図面

【図1】



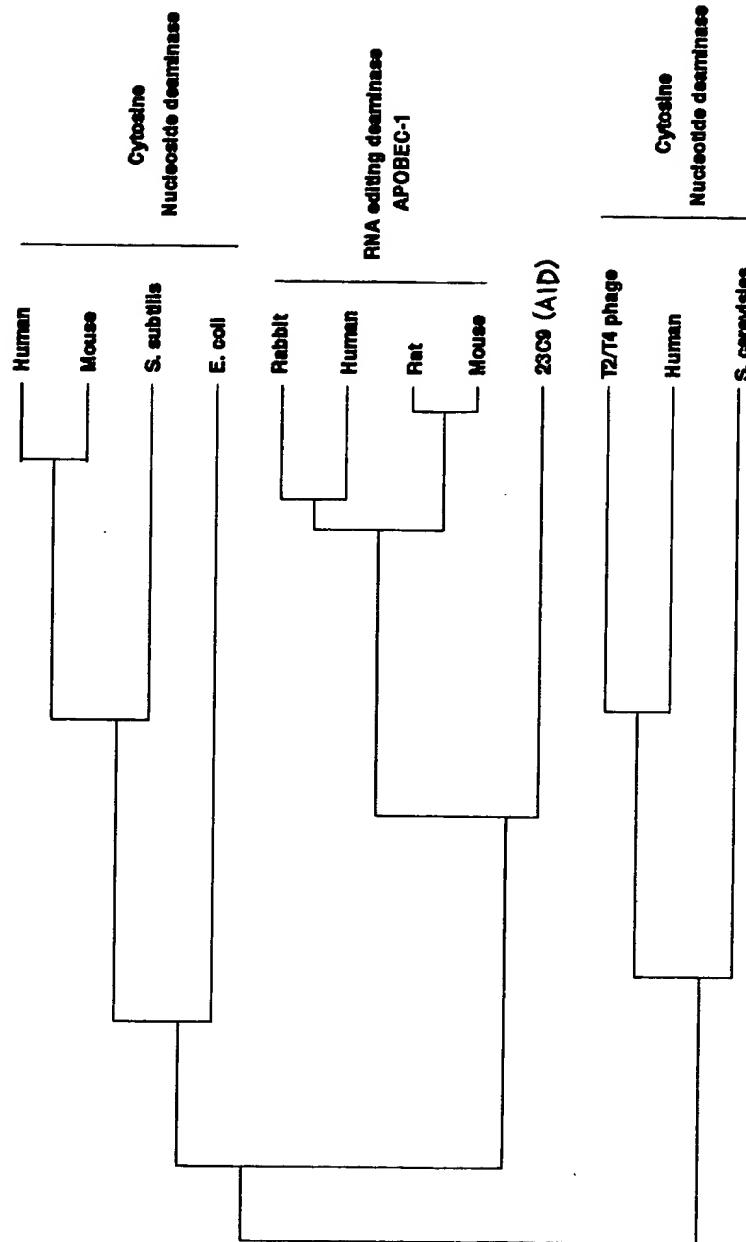
【図2】



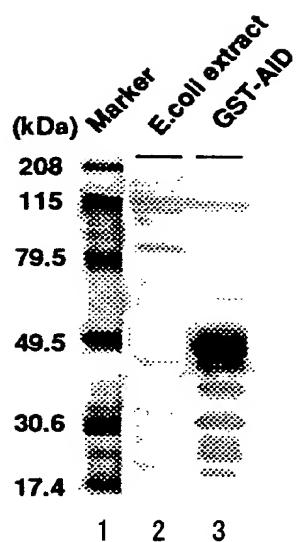
【図3】

mAID	1	---D--SL-L-MK-QKKF-LYHFKNVRW-AKG-RHETYLCYVKKRDSATCSLDFGHLR	50
mAPOBEC-1	1	MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEF-EVFDPRELRKETCLLYEIN-W-GGRH-SV-WRHTS	55
mAID	51	NKSGCHVELLFL-RYISDWDLDP-GRCYRVTFITSWSPCYDCARHVAEFLRWNPNLSTRI	108
mAPOBEC-1	56	QNTSNHVEVNFLLEKFTTERYFRPNTRC-SITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRHPYVTLFI	114
mAID	109	FTARLYFCEDRKAEPPEGLRRILHRAGVQIIGIMTFKDYFYCWNTFVENRERTFKAMEGLHEN	168
mAPOBEC-1	115	YIARLYHHTDQR-NRQGLRDQISSGVITQIMTEQEYCYCWRFNVNYPSPSNEAYWPRYPHL	173
mAID	169	SVRL-TRQIIRRILPPIYE-VDDILRDAFRMLGF-----	198
mAPOBEC-1	174	WWKLYVLELYCIIILGPPCLKILRRKQPQLTFTITLQTCHYQRIPPHLLWATGLK	229

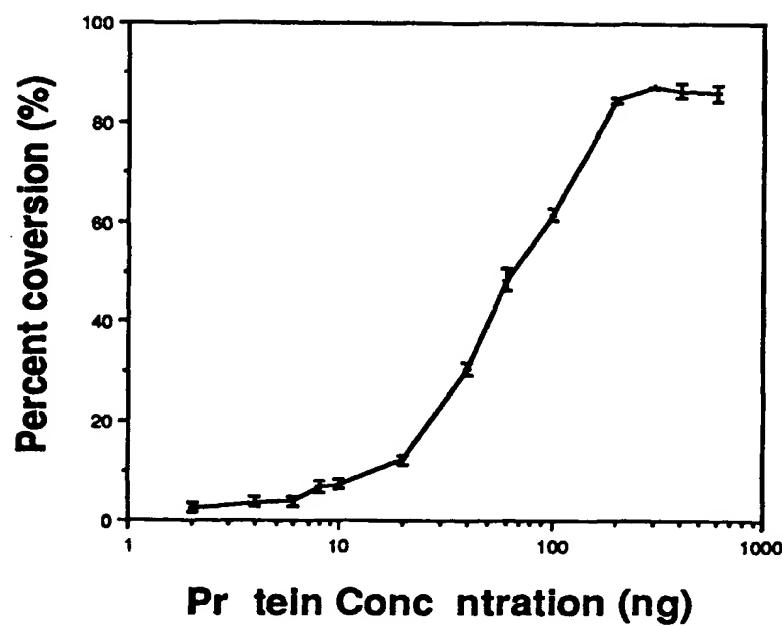
【図4】



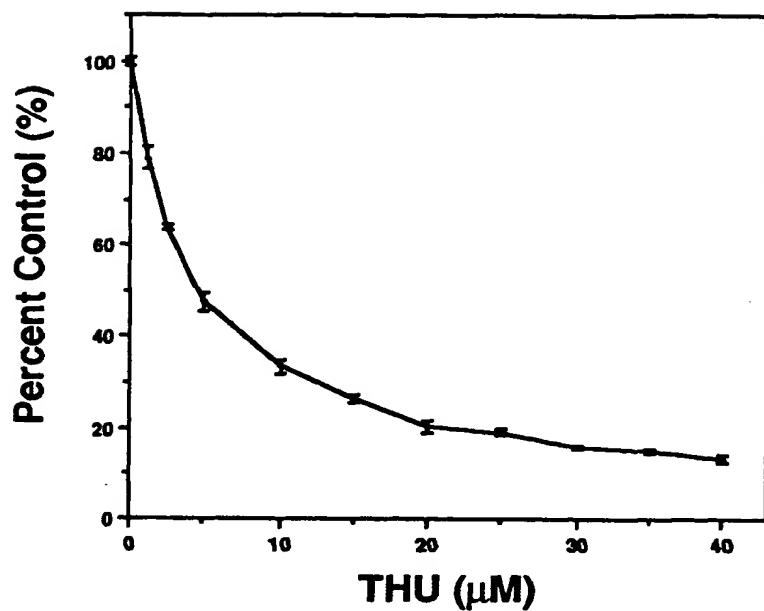
【図 5】



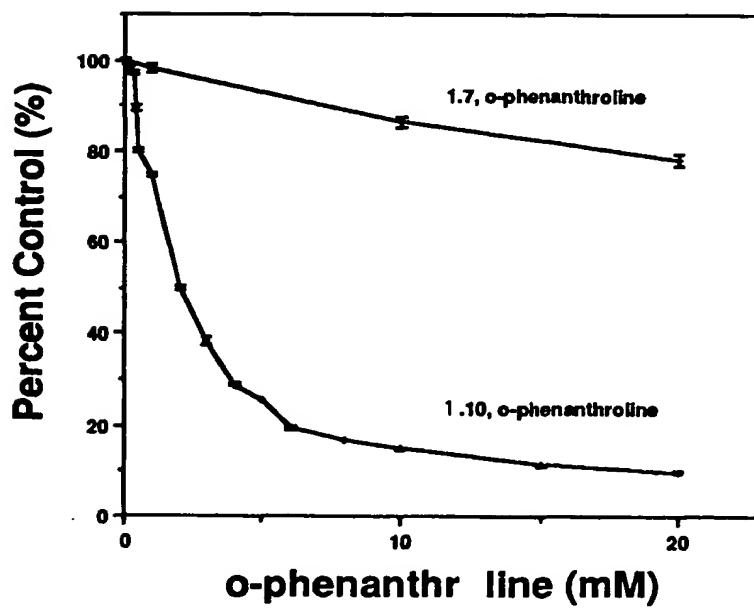
【図 6】



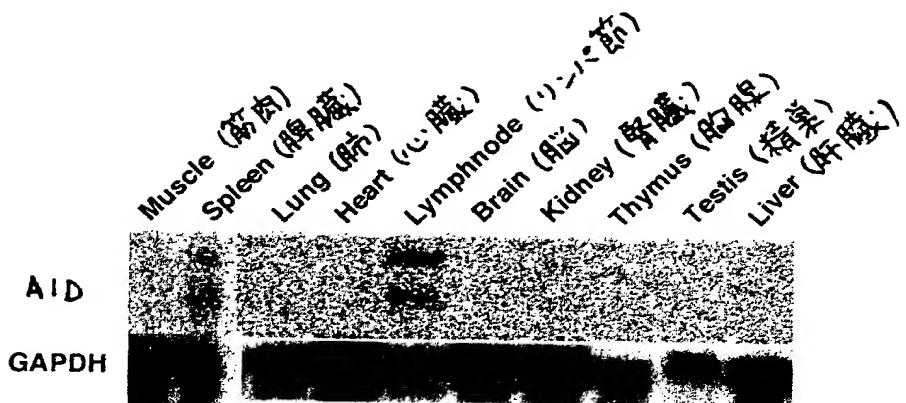
【図 7】



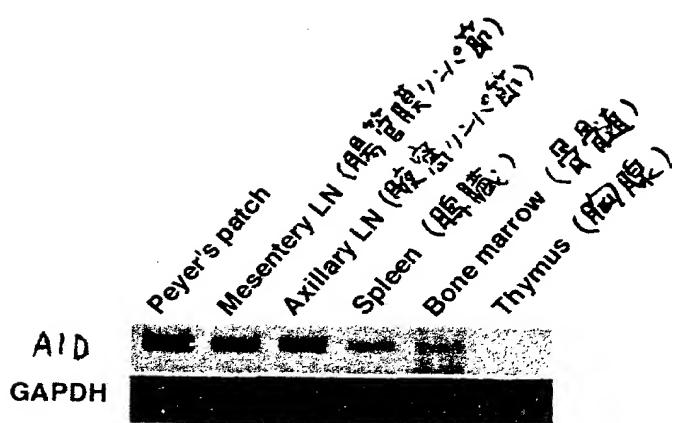
【図 8】



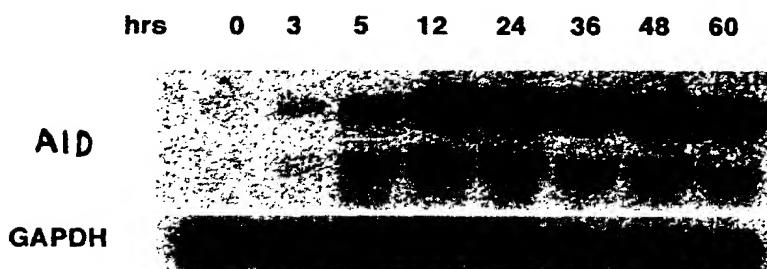
【図 9】



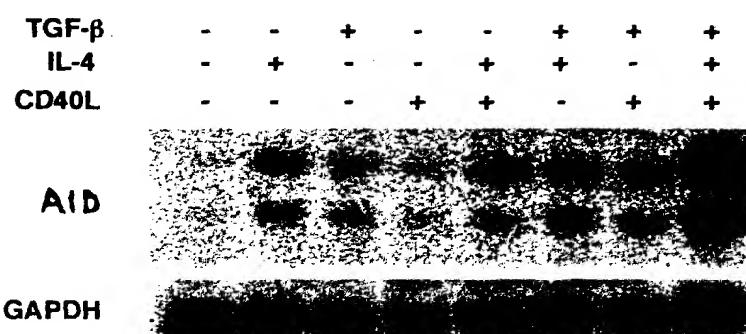
【図 10】



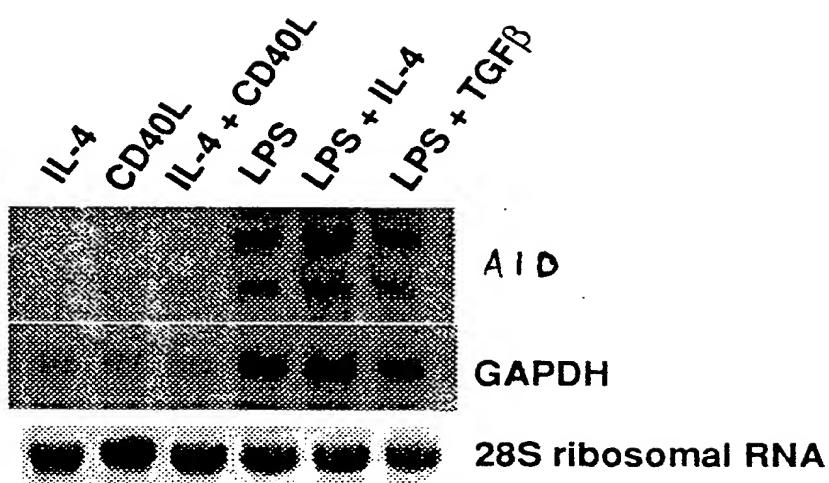
【図 1 1】



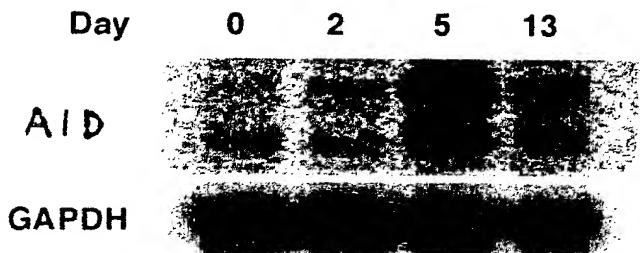
【図 1 2】



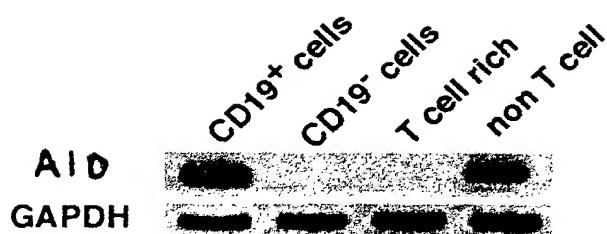
【図 1 3】



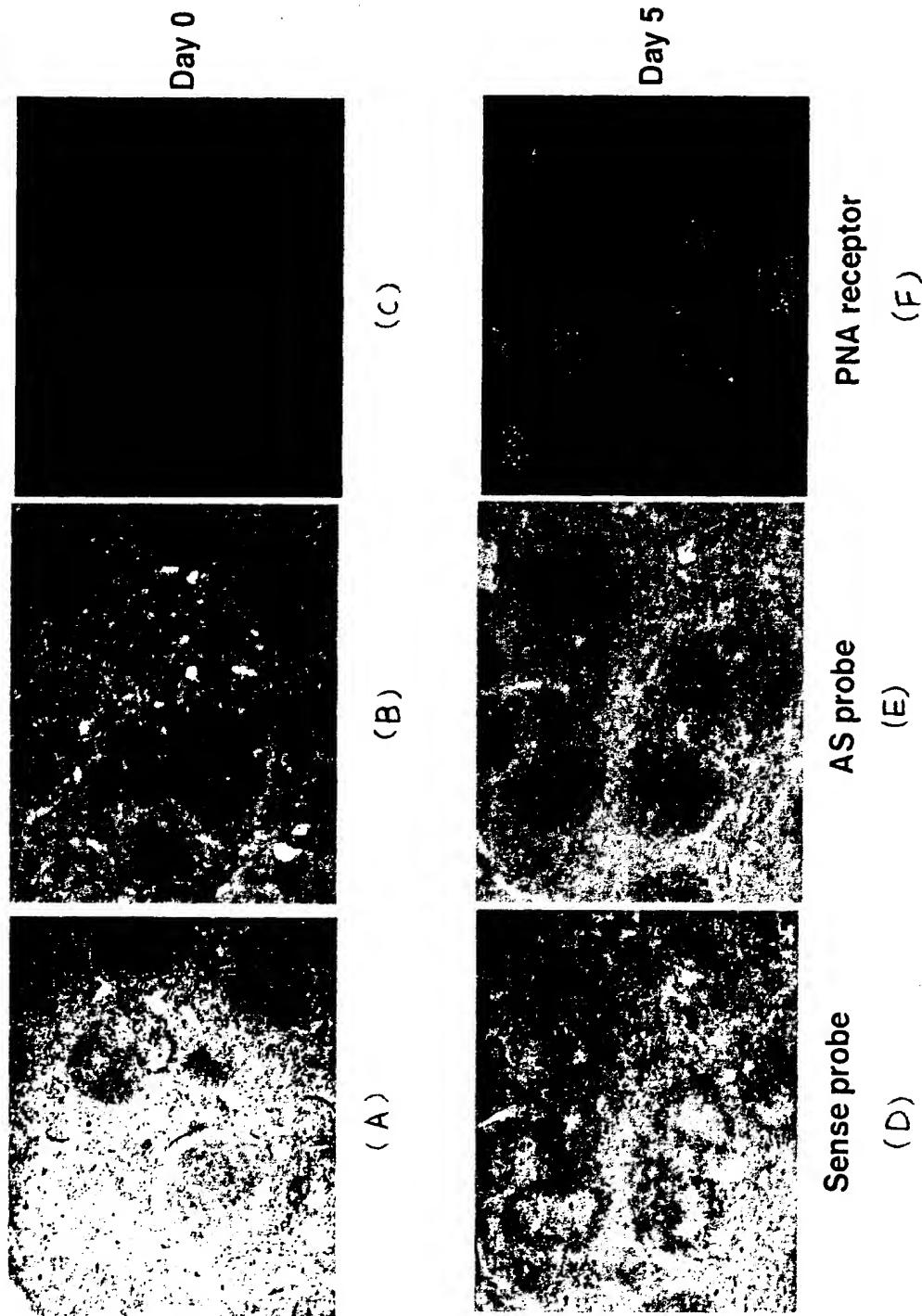
【図14】



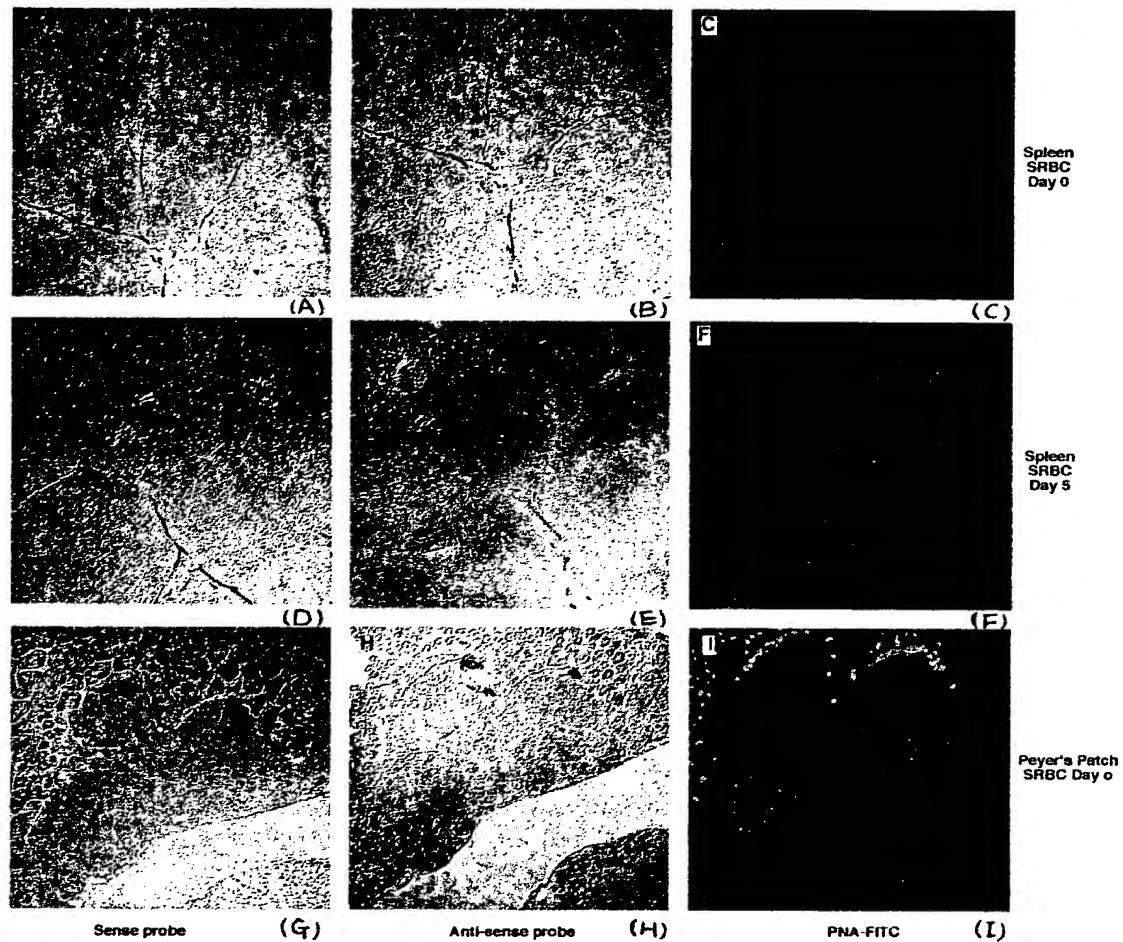
【図15】



【図16】



【図17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 B細胞の活性化の制御、並びに免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組換え、体細胞超変異 (somatic hypermutation) 及びアフィニティーマチュレーション (affinity maturation) のような胚中心機能 (germinal center function) に特有な遺伝子修飾 (genetic editing) において重要な役割を担う新規RNA修飾デアミナーゼ、該酵素をコードするDNA、並びに該酵素に対する抗体を提供する。

【解決手段】 サイトカインの刺激による細胞の活性化に伴い極めて高い割合で IgMからIgAへのクラススイッチ組換えを起こすマウスB細胞クローンCH12F3-2について、刺激を与えた該B細胞と未刺激の該B細胞の場合の各々についてcDNAライブラリーを作製し、これらを用いてサブトラクションクローニングを行うことにより、RNA編集酵素の1つであるAPOBEC-1と構造的な関連性を有し、APOBEC-1と同様のシチジンデアミナーゼ活性を有するAID (Activation-Induced cytidine Deaminase) と命名した新規タンパクをコードする遺伝子を見出した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第087192号
受付番号	59900289892
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成11年 3月31日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成11年 3月29日

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 J1-101

【提出日】 平成11年 6月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第 87192号

【承継人】

【識別番号】 396023812

【氏名又は名称】 本庶 佑

【承継人代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【承継人代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 4,600円

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第087192号
受付番号	59900600686
書類名	出願人名義変更届
担当官	林本 光世 2305
作成日	平成11年 8月26日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	396023812
【住所又は居所】	京都府京都市左京区岩倉大驚町19-4
【氏名又は名称】	本庶 佑
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志
【承継人代理人】	
【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	橋本 一憲

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名 日本たばこ産業株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [396023812]

1. 変更年月日 1998年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 京都府京都市左京区岩倉大鷺町19-4

氏 名 本庶 佑